

**RÔLE DU CONTRÔLE DE L'HOMÉOSTASIE DES miARN DANS
LA MISE EN PLACE DE L'IMMUNITÉ CHEZ *ARABIDOPSIS*
*THALIANA***

par

Refka Ajmi

Thèse présentée au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, février 2021

Le 23 février 2021

Le jury a accepté la thèse de Madame Refka Ajmi dans sa version finale.

Membres du jury

Professeur Kamal Bouarab
Directeur de recherche
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Chercheur Martin Fillion
Évaluateur externe
Agriculture et Agroalimentaire Canada

Professeure Pascale Beauregard
Évaluatrice interne
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Professeur François Malouin
Président-rapporteur
Département de biologie
Université de Sherbrooke

REMERCIEMENTS

Mes remerciements les plus sincères vont à mon directeur de thèse, Prof. Kamal Bouarab, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler au sein de son laboratoire, pour l'aide, les directives et l'encouragement qu'il m'a procuré surtout durant les moments les plus difficiles. Il a toujours bien veillé à ce que je réussisse mon projet et à ce que j'aie une formation de qualité. Je lui suis très reconnaissante.

Je remercie aussi mes conseillers, Prof. François Malouin et Prof. Pascale Beauregard, qui m'ont accompagné tout au long de mon parcours et m'ont assisté avec leurs conseils et commentaires constructifs ainsi que Dr. Martin Filion pour avoir accepté d'être l'examineur externe de ma thèse. Je tiens à remercier aussi mes collègues; Fabrice Betoudji, Marie Dibor Diam, Rocio Gonzalez-Lamothe et Taha Abd El Rahman pour leur soutien, leur sens du travail d'équipe et pour rendre l'ambiance du travail au laboratoire aussi agréable. Un grand Merci à l'Université de Sherbrooke, au centre Sève et aux autres organismes qui ont participé au financement de ce projet; CRSNG et FRQNT.

À mes Chers parents, aucune expression ne pourrait exprimer la gratitude et la reconnaissance que je leur voue pour tout le soutien qu'ils m'ont procuré. Leur bienveillance et leurs sacrifices m'ont fait voir que je devais faire de mon mieux pour devenir la personne que je suis aujourd'hui. À ma superbe sœur Rihab et mes frères Mootaz et Maamoun qui ont toujours cru en moi. Un très grand merci à ma chère amie et collègue Safa qui m'a toujours soutenu toutes ces années de doctorat.

Enfin, je voudrais exprimer ma reconnaissance et ma gratitude à mon cher mari Souhaieb, qui avec beaucoup de patience a su me procurer le soutien moral et l'ambiance propice pour que je puisse réussir mon doctorat sans oublier ma petite perle Jizelle, qui m'a comblé d'amour et n'a jamais cessé de semer le bonheur autour de moi.

SOMMAIRE

Afin de gagner la bataille contre les multitudes attaques microbiennes, les plantes ont développé et ont acquis au cours de leur évolution une flotte de mécanismes qui leur permettent de réussir la réponse immunitaire. Le phénomène de l'ARN d'interférence a pu montrer au fil du temps son importance dans la mise en place de l'immunité chez les plantes. Les microARN sont des petits ARN non-codants qui sont retrouvés impliqués aussi bien dans le développement que dans les réponses de défense. Dans le but de contrôler et conserver l'intégrité de ses tissus, la plante veille à ce que l'accumulation et la dégradation des petits ARN non-codants soient bien contrôlées. La découverte des protéines SDN (Small RNA degrading nucleases) chez la plante modèle *Arabidopsis* vient confirmer la stratégie du contrôle de l'homéostasie des miARN. Dans le présent travail, on a pu démontrer que les protéines SDN1 et SDN2 sont importantes à la mise en place des réponses immunes et de la résistance locale médiée par la flagelline et l'effecteur AvrPphB contre respectivement *Pst* DC3000 et *Pst* DC3000 exprimant AvrPphB chez *A. thaliana*. Ces protéines contribuent à l'activation de la voie de signalisation de l'acide salicylique, dont l'accumulation de la protéine PR1. Remarquablement, SDN1 et SDN2 sont aussi requises pour l'activation de la résistance systémique acquise médiée par la flagelline. Elles contrôlent la voie de l'acide salicylique dont l'expression de la PR1 et la voie de biosynthèse de l'acide pipécolique, deux voies importantes pour la mise en place de la résistance systémique acquise. De plus, on a pu mettre en évidence l'implication des protéines SDN dans la communication intercellulaire en agissant au niveau de l'induction de PDL5 ; une protéine importante pour la régulation de la perméabilité des plasmodesmes et la mise en place de la résistance systémique acquise. Ce projet nous a permis de disséquer un phénomène unique participant à la mise en place de l'immunité chez les plantes. Ainsi, les résultats obtenus ouvrent les horizons devant le développement de nouvelles stratégies et alternatives telle que l'utilisation de plantes qui bénéficient d'un système immunitaire plus

efficace afin de contrer les invasions de pathogènes et réduire le recours aux pesticides et aux produits chimiques nocifs à l'environnement mais aussi à la santé humaine.

Mots clés: miARN, SDN1, SDN2, *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas syringae* DC3000, immunité des plantes.

TABLES DES MATIÈRES

CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 <i>Impacts des maladies sur la production végétale</i>	2
1.2 <i>Systèmes de défense des plantes</i>	3
1.2.1 Les défenses constitutives	4
1.2.2 Défenses induites.....	5
1.2.2.1 La résistance basale	6
1.2.2.2 La résistance spécifique.....	8
1.2.2.3 Résistance systémique acquise	9
1.2.2.4 Signaux mobiles	11
1.2.2.5 Mouvement des signaux mobiles	12
1.3 <i>Dialogue des phytohormones</i>	14
1.3.1 Phytohormones impliquées dans l'immunité des plantes.....	14
1.3.2 Voie de l'acide salicylique	15
1.4 <i>Phénomène de l'ARN d'interférence</i>	17
1.4.1 Les petits ARN non-codants.....	18
1.4.1.1 La voie des miARN	19
1.4.1.2 La découverte des miARN	20
1.4.1.3 Biogenèse des miARN	20
1.4.1.4 Diversité et rôle des miARN	21
1.4.1.5 Régulation des miARN.....	23
1.4.1.6 Les protéines SDN.....	25
1.4.1.7 Mouvement des miARN.....	26
1.5 <i>Hypothèse et objectifs du projet de recherche</i>	27

CHAPITRE 2.....	30
IMPLICATION DES PROTÉINES SDN DANS LA MISE EN PLACE DES RÉPONSES DE DÉFENSES CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	30
2.1 <i>Préambule</i>	30
2.2 <i>Article</i>	32
2.2.1 Abstract.....	32
2.2.2 Introduction.....	34
2.2.3 Results.....	37
2.2.3.1 <i>sdn1sdn2</i> plants are Compromised in FLS2- and RPS5-Mediated Resistance Against <i>Pst</i> DC3000 and <i>Pst</i> DC3000 expressing AvrPphB, respectively.	37
2.2.3.2 Salicylic Acid Pathway is Affected in <i>sdn1sdn2</i> plants.....	40
2.2.3.3 SDN1 and SDN2 are not required for the induction of the two marker genes WRKY22 and WRKY29	43
2.2.3.4 Basal Expression Levels of RPS5 and PBS1 Are not Affected in <i>sdn1sdn2</i> plants	46
2.2.3 Discussion	47
2.2.4 Material and methods.....	48
2.2.4.1 Plant and bacterial materials and growth conditions.....	48
2.2.4.2 Flagellin treatment.....	49
2.2.4.3 Plant inoculation assays.....	49
2.2.4.4 Protein extraction and Western Blot analysis.....	51
2.2.4.5 Salicylic acid quantifications.....	51
2.2.4.6. RNA extraction and qPCR analysis	53
2.2.4.7. Statistical analysis	54
2.2.5. References.....	56

CHAPITRE 3.....	60
LES PROTÉINES SDN SONT REQUISES POUR L'ACTIVATION DE LA RÉSISTANCE SYSTÉMIQUE ACQUISE CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	60
3.1 <i>Préambule</i>	60
3.2 <i>Article</i>	62
3.2.1 Abstract.....	63
3.2.2 Introduction.....	64
3.2.3 Results.....	69
3.2.3.1 Systemic resistance flg22-mediated against <i>Pst</i> DC3000 is affected in <i>sdn1sdn2</i> plants.....	69
3.2.3.2 Systemic PR1 gene expression is compromised in <i>sdn1sdn2</i> plants	71
3.2.3.3 Local activation of the pipecolic acid biosynthesis pathway relies on SDN1 and SDN2 protein, unlike that of Azelaic acid	72
3.2.3.4 Pipecolic acid biosynthesis pathway is compromised systemically in <i>sdn1sdn2</i> plants.....	75
3.2.3.5 PDL5 systemic gene expression is defective in the absence of SDN proteins.....	77
3.2.4 Discussion and conclusion.....	79
3.2.5 Material and methods.....	82
3.2.5.1 Plant and bacterial materials and growth conditions	82
3.2.5.2 Flagelline treatment	82
3.2.5.3 Plant inoculation assay.....	82
3.2.5.4 RNA extraction and qPCR analysis.....	83
3.2.5.4 Statistical Analysis.....	84
3.2.5.5 Acknowledgments.....	84
3.2.5.6 Supplemental Data	85
3.2.6 References.....	86

CHAPITRE 4.....	97
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	97
<i>4.1 Implication des protéines SDN dans la mise en place de l'immunité basale et spécifique.....</i>	<i>97</i>
<i>4.2 Rôle des protéines SDN dans la mise en place de la Résistance systémique acquise</i>	<i>99</i>
<i>4.3 Conclusion générale et perspectives</i>	<i>100</i>
BIBLIOGRAPHIE	105

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3'UTR	<i>Three prime Untranslated Transcribed Region</i>
ABA	<i>Absciscic Acid</i>
ACD6	<i>Accelerated Cell Death 6</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AGO	Argonaute
AJ	Acide jasmonique
ALD1	<i>AGD2-Like Defense Response Protein1</i>
AP2	APETAL2
ARN	Acide ribonucléique
Avr	Protéine d'avirulence
AvrPphB	<i>Pseudomonas phaseolicolaB</i>
AvrPto	Avirulence protein of <i>Pseudomonas syringae</i> pathovar tomato
AvrRpm1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. Maculicola
AvrRps4	Effecteur de <i>Pseudomonas syringae</i>
AZA	Acide azélaïque
AZI1	<i>Azelaic Acid-induced 1</i>
BAK1	<i>BRI1-Associated Kinase 1</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CERK1	<i>Chitin Elicitor Receptor/LYSM domain receptor-like kinase 1</i>
CMV	Virus de la mosaïque de concombre
DCL	<i>Dicer Like Protein</i>
Dicer	Ribonucléase de la famille des ARNase III
EDS1	<i>Enhanced disease susceptibility 1</i>
ERF	Facteur de transcription sensible à l'éthylène
ETI	<i>Effector Triggered Immunity</i>

FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FLS2	<i>Flagellin Sensitive 2</i>
FMO1	<i>Flavine-dependent monooxygenase 1</i>
FRK1	<i>Flagellin-Induced Receptor Kinase 1</i>
G3P	glycérol-3-phosphate
hc-siARN	<i>heterochromatic siRNA</i>
HEN	<i>HUA enhancer</i>
HR	Réaction d'hypersensibilité
ICS	<i>Isochorismate synthase</i>
KB	King B
LRR	répétition riche en leucines
MAPKinase	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MeSA	Méthyl salicylate
miARN	microARN
MS	Murashige et Skoog
MYB	Une famille de facteurs de transcription avec un domain de liaison MYB
NAC	Une famille de facteurs de transcription à motif NAM, ATAF et CUC
NHP	<i>N-hydroxy-pipecolic acid</i>
NPR1	<i>Non-expressor of Pathogenesis-Related genes 1</i>
PAD4	<i>Phytoalexin deficient 4</i>
PAL	<i>Phenylalanine ammonia lyase</i>
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PBS1	AvrPphB Susceptible 1
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDLP	<i>Plasmodesmata located proteins</i>
Pip	<i>Pipecolic acid</i>
PR	<i>Pathogenesis related protein</i>
Pré-miARN	Précurseur de microARN
Pri-miARN	microARN primaire

PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato
Pst DC3000	<i>P. syringae</i> pv tomato DC3000
PTGS	<i>Post Transcriptional Gene Silencing</i>
PTI	Immunité induite par les PAMPs
RDR	ARN polymérase dépendante de l'ARN
REX	<i>RNA Exonucleases</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPM1	<i>Resistance to Pseudomonas Maculicola 1</i>
RPS4	<i>Resistance to Pseudomonas Syringae 4</i>
RPS5	<i>Resistance to Pseudomonas Syringae 5</i>
RT-PCR	Réaction de Transcription inverse suivie d'une PCR
AS	Acide salicylique
SABP2	<i>Salicylic acid-binding protein 2</i>
SAG	<i>Salicylic acid glucoside</i>
SAR	<i>Systemic acquired resistance</i>
SARD4	<i>SAR Deficient 4</i>
SDN	<i>Small RNA-degrading nucleases</i>
siARN	Petit ARN d'interférence
Tasi-ARN	trans-acting siRNA
TGA	<i>TGACG-Binding Factors</i>
TGS	<i>Transcriptional Gene Silencing</i>
TIR	Récepteur Toll interleukine
WB	<i>Western Blot</i>
WRKY	Facteur de transcription chez les plantes à motif WRKY
XRN	5'-3' exoribonuclease

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 2

Table 2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> mutants used in this study.....	49
-----------	---	----

Table 2.2	Primers used in this study.....	55
-----------	---------------------------------	----

Chapitre 3

Table 3.S1	Primers used in this study.....	86
------------	---------------------------------	----

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1.1	Modèle illustrant l'interaction entre FLS2 et BAK1 suite à une perception de flagelline.....	7
Figure 1.2	Schéma récapitulatif du système de défenses induites chez les plantes.....	10
Figure 1.3	Voie de la biosynthèse de l'acide pipécolique.....	12
Figure 1.4	Mouvement des signaux mobiles impliqués dans la résistance systémique acquise.....	13
Figure 1.5	Voies de synthèse de l'acide salicylique.....	15
Figure 1.6	Voies et origines des petits ARN non codants chez les plantes.....	19
Figure 1.7	Biogenèse des miARN.....	21
Figure 1.8	Implication des protéines SDN dans le processus de dégradation des microARN mature et méthylés.....	26
Figure 1.9	Mouvement de courte et longue distance des petits ARN d'interférence au sein des cellules végétales.....	27

Chapitre 2

Figure 2.1	<i>sdn1sdn2</i> double mutant is compromised in FLS2- and RPS5-mediated resistance against respectively <i>Pst</i> DC3000 and <i>Pst</i> DC3000 expressing AvrPphB in <i>Arabidopsis</i>	39
Figure 2.2	The accumulation of PR1 is affected in <i>sdn1sdn2</i> plants in response to flg22 treatment and <i>Pst</i> DC3000 expressing AvrPphB inoculation.....	42

Figure 2.3	Salicylic acid accumulation in response to flg22 treatment and <i>Pst</i> DC3000 expressing AvrPphB inoculation in <i>Arabidopsis</i>	43
Figure 2.4	Early responses induced by flg22 are not affected in <i>sdn1sdn2</i> plants.....	45
Figure 2.5	Basal levels of RPS5 and PBS1 in <i>sdn1sdn2</i> plants.....	46

Chapitre 3

Figure 3.1.	<i>sdn1sdn2</i> double mutant plants exhibit a defective systemic resistance mediated by flg22 against <i>Pst</i> DC3000.....	70
Figure 3.2.	SDN1 and SDN2 proteins are essential for the systemic PR1 gene expression induced by flg22.....	72
Figure 3.3.	SDN proteins are required to induce pipecolic acid biosynthesis in local leaves, but not in the case of azelaic acid.....	74
Figure 3.4.	Systemic induction of FMO1 and ALD1 gene expression mediated by flg22 depends on SDN1 and SDN2 protein activity.....	76
Figure 3.5.	SDN proteins control systemic expression of PDL5 in response to flg22.....	78

Chapitre 4

Figure 4.1.	Schéma récapitulatif illustrant les résultats et les perspectives.....	103
-------------	--	-----

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Les plantes constituent un maillon très important dans la chaîne alimentaire animale et humaine vu qu'elles représentent leur première source énergétique. Comme tous les autres organismes multicellulaires, les plantes sont affectées aussi bien par le stress abiotique que par le stress biotique qui est causé principalement par des phytoravageurs tels que les insectes, les champignons et les bactéries. Ces stress représentent ainsi des facteurs très limitants du développement et de la production végétale (Ben Rejeb et al., 2014; Jackson, 1986; Pereira, 2016).

Les différentes attaques de phytoravageurs se manifestent par diverses réponses et symptômes dépendamment des agents pathogènes (Pernezny et al., 2014). Malgré le fait que les plantes ne bénéficient pas de cellules immunitaires mobiles et spécialisées et malgré leur apparence sessile, elles arrivent à se défendre efficacement contre une multitude d'attaques pathogènes (Ausubel, 2005). En effet, suite à la détection d'un agresseur, les plantes déploient des acteurs de défenses spécifiques leur permettant d'avoir des réponses immunitaires adéquates (Morris & Moury, 2019).

Parallèlement au développement du système de défense des plantes, les agents pathogènes ont développé aussi des mécanismes qui viennent inhiber dans certains cas la réponse immune, favorisant ainsi la propagation de ces derniers et par conséquent l'apparition des maladies (Dodds & Rathjen, 2010; Gang et al., 1999).

Dans le but de minimiser l'impact des maladies et les infestations par les phytoravageurs, le recours aux produits chimiques demeure la méthode la plus souvent adoptée. Bien qu'elle soit considérée la plus efficace, l'utilisation des pesticides reste toujours nocive et cause

des problèmes au niveau de la santé humaine ainsi qu'au niveau de l'environnement (Lebailly et al., 2007).

1.1 Impacts des maladies sur la production végétale

Depuis quelques années, la sécurité alimentaire est devenue un sujet très préoccupant. En fait, avec une démographie qui ne cesse de croître, assurer la disponibilité des aliments figure comme une priorité à l'échelle mondiale.

L'alimentation se traduit majoritairement au niveau de la production végétale qui couvre l'alimentation humaine et animale. En effet, ce secteur fait face à plusieurs contraintes ; entre autres la baisse de la qualité et de la quantité de la production liées à une insuffisance au niveau des différentes ressources ainsi que la propagation des différentes maladies phytopathogènes affectant les plantes.

Selon l'organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), environ 30% de la perte des récoltes mondiales est causée par les attaques de différents agents biotiques qui représentent ainsi l'un des grands défis du secteur agricole. Les maladies qui frappent les plantes peuvent être d'origine fongique, bactérienne et virale ainsi les symptômes et les dégâts causés dépendent fortement du type de ravageur. Environ 85% des maladies des plantes sont causées par des champignons (Pernezny et al., 2014).

La production végétale est le pivot de l'agriculture. Elle génère des gains économiques importants. Ce secteur fait face à des contraintes majeures entre autres, l'exposition à une multitude d'infestations de pathogènes. En 2002 par exemple, une infestation des champs de pommier par *Erwinia amylovora*, l'agent causal de la brûlure bactérienne, a engendré une perte de revenus estimée à environ 720,000 \$ au niveau de la province Canadienne du Québec (Selon Agriculture, pêche et alimentation Québec). D'autres maladies telle que la fusariose des céréales, a causé des épidémies dans le secteur durant les années 90 aux

États-Unis et au Canada (Cowger & Sutton, 2005; Tekauz et al., 2000). La fusariose des céréales a provoqué une réduction en flèche de la qualité des graines et du rendement causant ainsi une baisse du prix de vente et imposant des coûts supplémentaires associés au contrôle de la qualité. La perte économique due à cette infestation a été estimée à environ 1 milliard de dollars au niveau de la région regroupant les États du Minnesota, Dakota du nord, Dakota du sud et les prairies de la province de Manitoba, marquant ainsi la plus grande perte causée par une maladie parasitaire pendant seulement une année en Amérique du nord (Mcmullen et al., 1997). Aussi, les différentes infestations causées par la bactérie à Gram négatif *Pseudomonas syringae* ont pu engendrer des pertes économiques importantes. Cette bactérie qui grâce à un grand nombre de pathovar est capable de s'attaquer à différents types de végétations et de cultures. Causant les chancres chez les arbres pérennes ce pathogène a réussi à détruire des milliers d'hectares de noisetier engendrant des pertes qui touchent 1,5 million de dollar (Lamichhane et al., 2014). De même, en 2012, une dissémination de *P. syringae* au niveau de plants de kiwi en nouvelle Zélande a conduit à une perte de rendement estimée de 21% ce qui a impliqué une perte économique de 76 millions de dollar (Lamichhane et al., 2014).

Outre que la perte de rendement et la baisse de la qualité de grains, l'infestation par les différentes espèces de *Fusarium* telles que *Fusarium gramineum* et *Fusarium sporotrichioides* engendre une contamination avec les mycotoxines T-2 et DON dont l'ingestion à des doses suffisantes peut causer des problèmes de santé chez l'humain et les animaux, pouvant affecter même le système immunitaire (Mann et al., 1984). Ces différentes attaques de phytoravageurs a imposé aux plantes le développement d'un système de défense qui leurs permettent de confronter les multitudes infestations.

1.2 Systèmes de défense des plantes

Chez les plantes, l'absence de cellules immunitaires spécialisées, de système circulatoire et de mémoire immunitaire ne font pas d'elles des proies faciles à coloniser par les

phytopathogènes (Ausubel, 2005). Dans la mesure de pouvoir se protéger des agressions biotiques, les plantes ont développé un système de défense impliquant la mise en place de certains mécanismes bien complexes et spécifiques conférant aux plantes la capacité de faire face à un large spectre de pathogènes (Dodds & Rathjen, 2010). Ce système est représenté par deux principales catégories; on distingue en premier l'ensemble des défenses constitutives, puis l'ensemble des défenses induites (Boots & Best, 2018; Pereira, 2016). Ces deux types de défenses interagissent entre eux d'une façon coordonnée afin d'assurer l'intégrité des cellules végétales en éliminant ses constituants altérés et les substances étrangères ou les agents infectieux auxquels elles sont exposées (Boots & Best, 2018).

1.2.1 Les défenses constitutives

La mise en place et l'activation des composantes des défenses constitutives ne nécessite pas la présence de l'agent pathogène. Ces composantes de défenses peuvent être aussi bien structurales que chimiques. Les barrières physiques que disposent les plantes sont les premiers obstacles que les microbes doivent franchir avant de coloniser leurs hôtes. On distingue entre autres la présence de cuticule au niveau des organes aériens qui est composée de cutine et de cire conférant ainsi une force mécanique et un pouvoir hydrophobe qui permet à la plante de s'opposer à la pénétration des pathogènes (Jetter & Schäffer, 2001; Schweizer et al., 1996; Suh et al., 2005). Une autre composante majeure des barrières structurales et caractéristique des végétaux est la paroi cellulaire. Cette dernière est composée de cellulose, de pectine et de lignine; ce qui procure l'imperméabilité et la rigidité au tissu végétal et représente un muret devant les envahisseurs (Cavalier et al., 2008; Walton, 1994). D'autres structures comme les cellules de garde qui sont responsables de l'ouverture des stomates participent aussi dans les défenses constitutives en contrôlant le fonctionnement des stomates et en empêchant le passage des agents pathogènes (Schulze-Lefert & Robatzek, 2006).

En plus de leurs composantes physiques, les plantes sont capables de sécréter une variété de composés chimiques visant l'inhibition de la propagation et de la croissance des microbes. Les métabolites secondaires produits, peuvent être présents soit sous leurs formes actives chez les plantes saines, soit conservés sous leurs formes inactives et seront activés en réponses à une attaque pathogène vue leur toxicité même pour la plante parmi lesquels on cite par exemple les glucosides, (Osbourn, 1996). Les plantes sont aussi capables de sécréter des phytotoxines qui agissent en tant que des produits antibactériens et antifongiques, tels que les composés cyanogènes, les saponines, les alcaloïdes et les terpenoïdes (Osbourn, 1996; Wittstock & Gershenzon, 2002). D'autres composés phénoliques provenant de la voie des phénylpropanoïdes comme par exemple les quinones et les isoflavonoïdes participent activement dans la dégradation de la paroi bactérienne (Gang et al., 1999).

1.2.2 Défenses induites

Le déclenchement et l'établissement des réponses de défenses induites dépendent de la détection et de la présence des microbes. Les agents pathogènes qui réussissent à faire face aux défenses constitutives se retrouvent confrontés à un éventail de stratégies de défenses qui se distinguent en premier par des modifications structurales et biochimiques, parmi lesquelles l'induction du dépôt local de la callose au niveau du site de l'infection (Ellinger et al., 2013). Ce glucane est capable d'entraver et ralentir la propagation du pathogène, donnant ainsi un laps de temps à la plante pour mobiliser ses acteurs de défense (Ellinger et al., 2013). De même, la synthèse de composés antimicrobiens comme les phytoalexines et leur accumulation au niveau du site de l'infection a été liée à la mise en place de la réaction d'hypersensibilité suite à la détection de l'agresseur (Tsuji et al., 1992). L'induction de la production des protéines liées aux agents pathogènes, les protéines PR, s'ajoute aussi au niveau de l'ensemble des défenses induites. On dénombre 17 familles de protéines PR chez les plantes (Sels et al., 2008), où la PR1 a été particulièrement identifiée pour son action antimicrobienne. En regardant au niveau moléculaire et génique de l'immunité des plantes, on distingue deux niveaux de résistance ; soient la résistance basale

et la résistance spécifique (Dodds & Rathjen, 2010). Ces deux voies de défenses ont pour mission l'élimination de l'agent pathogène. Elles partagent certains aspects et métabolites essentiels mais disposent de différents mécanismes d'action (Dodds & Rathjen, 2010).

1.2.2.1 La résistance basale

La résistance basale désigne le premier niveau de défense chez les plantes. Cette résistance est induite lorsqu'une plante sent la présence d'un agent pathogène, impliquant ainsi l'existence d'un système qui lui permet de détecter son agresseur. Certes, les plantes sont équipées d'un ensemble de récepteurs transmembranaires appelés PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) qui sont capables de reconnaître des motifs conservés chez les différents pathogènes appelés PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) (J. Zhang & Zhou, 2010). C'est au moment de la reconnaissance des PAMPs par les PRRs que la plante active la première réponse immunitaire innée appelée aussi PTI (*PAMPs triggered immunity*) (Dodds & Rathjen, 2010). Ces molécules de provenance microbienne, déclencheurs de l'immunité, peuvent être des protéines, des carbohydrates ou des lipides. On pourrait ainsi citer les exemples de la flagelline, le facteur d'élongation bactérien ou de la chitine d'origine fongique (Boller & Felix, 2009). La mise en place de la PTI est associée à des modifications métaboliques et géniques précoces ou tardives. Précédée d'un flux ionique de H^+ et de Ca^{+} qui mène à une alcalinisation du milieu cellulaire, l'induction d'une flambée oxydative en produisant des ROS (Reactive Oxygen Species) est une réponse précoce induite suite à la détection de pathogènes (Smith et al., 2014). Cette réponse physiologique est en amont de l'induction de la cascade de MAPKinase (Xu et al., 2014) qui agit à son tour sur l'expression des facteurs de transcription tels que les WRKYs, notamment WRKY22 et WRKY29 (Kim & Zhang, 2004). Ces facteurs de transcriptions agissent sur l'expression des gènes marqueurs de cette première ligne de défense, parmi lesquels les gènes codant pour les protéines PR (*Pathogenesis related protein*) principalement la PR1 (Gamir et al., 2017) et le gène FRK1 (*Flagelline like-receptor kinase 1*) (Zou et al., 2018).

Entre autres, les deux modèles de reconnaissance de PAMP/PRR les plus étudiés sont ceux des récepteurs FLS2 (*FLAGELLIN SENSITIVE 2*) et EFR (*EF-Tu Receptor*), percevant respectivement la flagelline qui est une sous-unité protéique du flagellum bactérien et le facteur d'élongation bactérien EF-Tu (Boller & Felix, 2009).

C'est en étudiant le modèle FLS2/flagelline que la découverte de l'importance du récepteur kinase riche en leucine, le BAK1 (*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1*) dans la mise en place de la PTI, fut réalisée. Bien qu'il n'interfère pas d'une façon directe dans la perception de l'éliciteur, BAK1 joue un rôle essentiel dans le déclenchement de la résistance basale induite par la flagelline. Il forme un complexe avec FLS2 suite à une élicitation résultant en une phosphorylation du récepteur et le début de la cascade de signalisation (Chinchilla et al., 2007) (Figure 1.1).

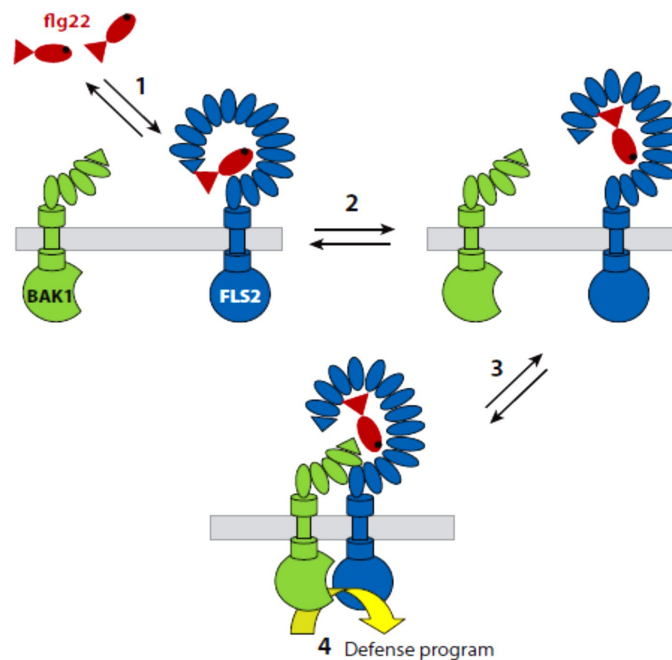


Figure 1.1. Modèle illustrant l'interaction entre FLS2 et BAK1 suite à une perception de flagelline (Boller & Felix, 2009).

Ce niveau de réponse immunitaire confère à la plante la capacité de contrer une multitude d'attaques. Cependant, à leur tour, les phytoravageurs ont emprunté l'évolution pour pouvoir survivre et réussir leurs invasions. En développant des mécanismes qui permettent l'inhibition de la résistance basale, cette évolution a amené les plantes à déployer des réponses de défense plus spécifiques en passant à un autre niveau de résistance.

1.2.2.2 La résistance spécifique

Afin de contourner la PTI, les pathogènes ont mis en place un système qui repose sur l'injection directe dans le milieu intracellulaire de la cellule hôte des protéines de virulence appelées effecteurs via un système spécifique tel que le système de sécrétion type III, existant par exemple chez la bactérie à Gram négatif *Pseudomonas syringae* (Dodds & Rathjen, 2010). Ces effecteurs vont inhiber la voie de la PTI et favoriser l'infection du pathogène. À leur tour, les plantes ont réussi à développer un système qui permet la reconnaissance intracellulaire de ces effecteurs par le biais des récepteurs spécifiques et ainsi déclencher le deuxième niveau de résistance appelé résistance spécifique ou aussi ETI (*Effector triggered immunity*) (Boller & Felix, 2009) (Figure 1.2).

La voie ETI est qualitativement plus ample, plus rapide et plus spécifique que la PTI. Chez *Pseudomonas syringae* on dénombre environ 29 effecteurs, dépendamment du pathovar (Chang et al., 2005). Certaines de ces protéines de virulence ont une activité enzymatique qui représente une arme puissante pour les agents pathogènes. Les effecteurs permettent d'altérer des composantes de la résistance activées lors de la mise en place de la PTI. Par exemple, l'effecteur AvrPtoB, grâce à sa ubiquitine ligase E3, est capable d'induire la dégradation d'une kinase importante à l'induction de la résistance appelée *Fen* (Rosebrock et al., 2007). De plus, ces protéines de virulence sont capables de freiner l'expression des gènes de défense et même la production des ROS (Smith et al., 2014).

Les effecteurs varient drastiquement entre les souches et les espèces mais sont capables parfois d'agir d'une façon redondante. Cette redondance a été illustrée par l'exemple des effecteurs de *P. syringae* AvrPto et AvrPtoB qui, tous les deux ciblent le complexe FLS2-BAK1 (Shan et al., 2008).

Les récepteurs intracellulaires reconnaissant les effecteurs sont des protéines encodées par des gènes de résistance appelés gènes R. Ainsi, le produit d'un gène R reconnaît le produit d'un gène codant pour un facteur de virulence, d'où vient l'appellation de ce niveau de résistance ; la résistance gène pour gène (Jia et al., 2000).

1.2.2.3 Résistance systémique acquise

Les plantes sont capables de générer une réponse de défense au niveau des sites autres que le site de l'infection primaire en tirant profit d'une première infection pour stimuler leur système immunitaire. Ce phénomène est appelé résistance systémique acquise (SAR). Ce type de résistance confère une protection plus efficace et une réponse de défense plus rapide et plus intense lors d'une infection secondaire contre un spectre important de pathogènes incluant les virus, les oomycètes, les champignons et les bactéries (Durrant & Dong, 2004). Il a été démontré aussi que l'effet de protection que la SAR procure aux plantes peut être transmis à la progéniture (Luna et al., 2012).

La mise en place de la SAR est associée à des modifications importantes au niveau transcriptionnel et au niveau protéique. En effet, l'établissement de la SAR dépend fortement de la voie de signalisation de l'acide salicylique (AS) et induit l'accumulation systémique de ce dernier, des protéines PR et induit aussi l'expression de quelques gènes liés à la défense (Durrant & Dong, 2004).

NPR1 est un coactivateur essentiel à l'activation de la SAR vue qu'il régule l'expression de la famille de facteurs de transcription TGA. Ces facteurs de transcriptions régulent

l'expression de la PR1 qui représente un marqueur classique du déclenchement de la résistance systémique (Fu & Dong, 2013).

La communication entre les différents organes et tissus de la plante est critique pour la mise en place de la SAR. La propagation de l'effet de la résistance du site de l'infection vers les tissus à distance au sein de la même plante implique l'existence d'un système de signalisation qui permet la communication intercellulaire mettant en jeu des acteurs systémiques (Shah & Zeier, 2013).

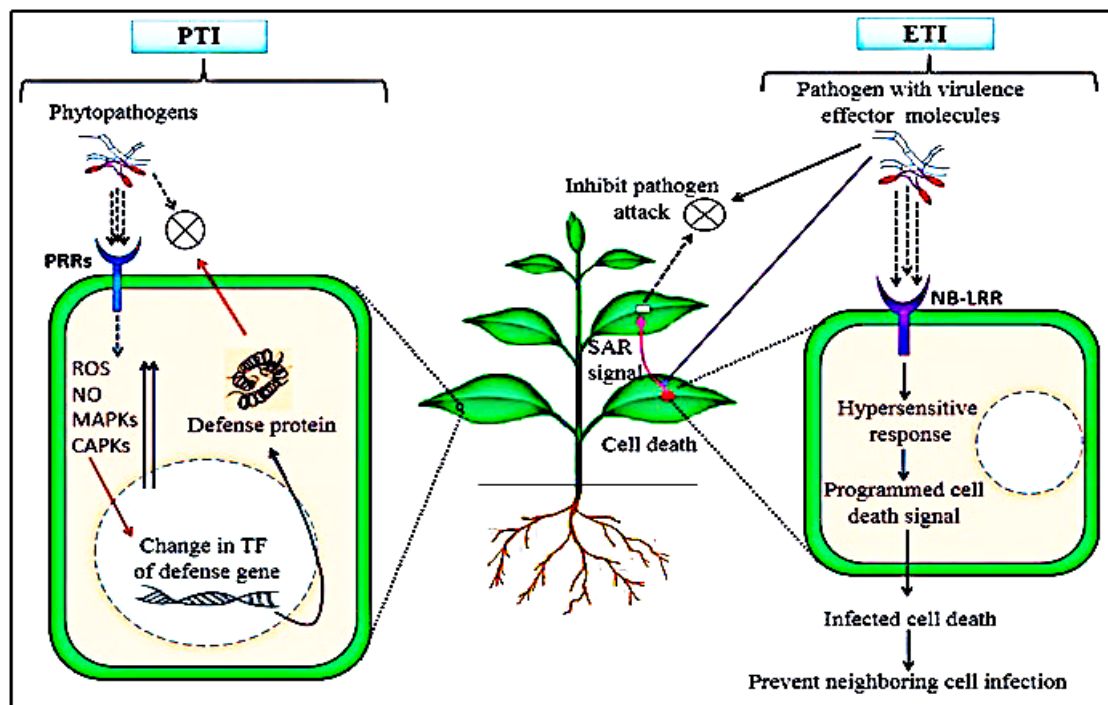


Figure 1.2. Schémas récapitulatif du système de défenses induites chez les plantes
(D.K.Choudhary et al., 2016)

1.2.2.4 Signaux mobiles

Afin d'assurer une SAR efficace, la plante utilise des signaux mobiles capables de bouger au sein de ses tissus assurant ainsi la communication intercellulaire.

Tout comme le glycérol-3-phosphate (G3P), l'acide azélaïque (AzA) a été classé comme un facteur essentiel à la SAR où son accumulation est repérable localement et systémiquement après une infection (Shine et al., 2019). Son importance a été mise en évidence en observant une résistance systémique plus ample accompagnée d'une importante accumulation de l'AS ainsi que de la PR1 chez des plantes qui ont reçu localement un traitement exogène de l'acide azélaïque. Cette constatation suggère ainsi la possibilité de la translocation de ce composé à travers les tissus et cellules végétales (Shah & Zeier, 2013). En étudiant la voie d'action de AzA, les recherches ont réussi à identifier le gène *AZI1* (*Azelaic Acid-induced 1*) comme un acteur indispensable pour l'action de ce métabolite. Ensuite, l'importance de *AZI1* dans l'établissement de la SAR a été démontrée en observant une résistance défectueuse chez mutant *azil* (Jung et al., 2009).

Bien qu'il soit important dans la réponse immune, l'AS localement accumulé à la suite d'une infection est converti en partie en méthyl-salicylate (MeSA). Ce conjugué joue le rôle d'un signal systémique qui migre à travers les vaisseaux conducteurs pour être reconverti aussitôt en AS par une estérase SABP2 (*salicylic acid-binding protein 2*) afin d'assurer la mise en place de la résistance systémique (Shah & Zeier, 2013).

En analysant la voie de la SAR, l'acide pipécolique (Pip) a été identifié comme un acteur important dans cette voie de défense. C'est un dérivé de la lysine qui est produit d'une façon importante après une invasion de pathogène (Kachroo & Robin, 2013). Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, ce métabolite est capable de s'accumuler localement au niveau du site de l'infection mais aussi au niveau des feuilles systémiques, suggérant ainsi son implication dans la mise en place de la SAR en tant qu'un signal mobile (Shine et al.,

2019). La biosynthèse de l'acide pipécolique nécessite impérativement l'induction de quelques gènes pivots localement et au niveau des feuilles distales. La lysine est prise en charge d'abord par l'aminotransférase produite de l'expression du gène *ALD1* (*AGD2-Like Defense Response Protein1*), ensuite par la réductase résultante de l'expression de *SARD4* (*SAR Deficient 4*) afin de produire l'acide pipécolique. Ce métabolite s'accumule et agit sous sa forme initiale mais aussi il peut être converti en NHP (*N-hydroxy-pipecolic acid*) par *FMO1* (*Flavine-dependent monooxygenase*) (Bernsdorff et al., 2016; Shan & He, 2018). C'est le NHP qui est proposé comme un signal mobile de la voie de Pip et est impliqué dans la SAR en agissant en amont de l'accumulation de l'AS (Shah & Zeier, 2013) (Figure 1.3).

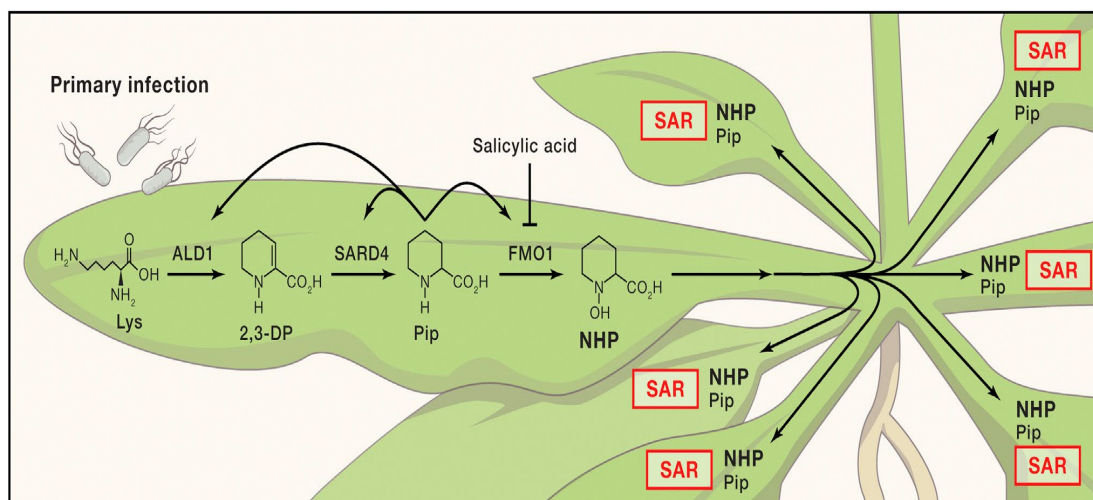


Figure 1.3. Voie de la biosynthèse de l'acide pipécolique (Shah & Zeier, 2013).

1.2.2.5 Mouvement des signaux mobiles

Produire les signaux mobiles est essentiel pour l'établissement de la résistance systémique. De ce fait, avoir un système fonctionnel permettant la translocation de ces signaux demeure indispensable pour avoir une SAR optimale. En effet, le passage des facteurs mobiles peut se faire à travers le symplaste ou l'apoplaste respectivement pour l'AS et ses conjugués ou le G3P, Pip et AzA (Shine et al., 2019). Contrairement au

transport via l'apoplaste qui se fait librement à travers l'espace vide extracellulaire entre les cellules végétales voisines, le mouvement des signaux mobiles via le symplaste se fait en traversant les plasmodesmes qui sont des structures de connexion intercellulaire. Il a été démontré que suivant une attaque microbienne, la plante joue sur la perméabilité des plasmodesmes afin de réguler le passage des métabolites et d'autres particules. Effectivement, en réponse à une situation de stress, les cellules végétales produisent des protéines spécifiques appelées PDLP (*Plasmodesmata located proteins*) qui s'accumulent au niveau des plasmodesmes et participent au contrôle de leur perméabilité (J. Y. Lee, 2015). Chez *A. thaliana*, on distingue huit PDLP où PDLP1 et PDLP5 ont été identifiés comme étant spécifiquement importants à la SAR (Lim et al., 2016). Des expériences réalisées avec des plantes surexprimant PDLP5 ont montré une réduction de la perméabilité des plasmodesmes couplée avec une déficience au niveau de la SAR chez ces plantes (Lim et al., 2016). Cette observation a pu mettre en évidence que la régulation de l'expression et de l'accumulation des PDLP est primordiale pour permettre le passage des signaux mobiles assurant la résistance (Figure 1.4).

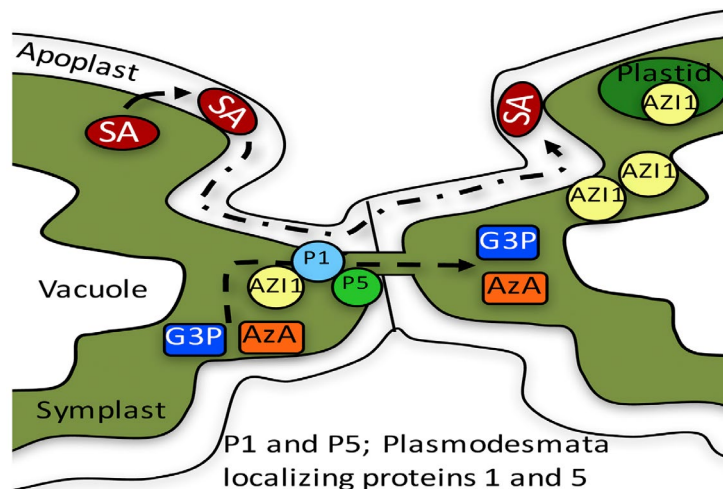


Figure 1.4. Mouvement des signaux mobiles impliqués dans la résistance systémique acquise (Lim et al., 2016).

1.3 Dialogue des phytohormones

Les plantes sont capables de produire différentes phytohormones telles que l'auxine, la cytokinine, l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène (Robert-Seilanianantz et al., 2011). Ces métabolites peuvent avoir un effet synergique ou antagoniste. Savoir comment balancer entre leurs différentes phytohormones afin de favoriser, soit le développement, soit une réponse de défense tout en conservant l'intégrité de leurs cellules, est un processus critique et compliqué chez les plantes.

1.3.1 Phytohormones impliquées dans l'immunité des plantes

Lors de la mise en place d'une réaction de défense, la plante favorise principalement la production de l'acide salicylique (AS), l'acide jasmonique (AJ) et l'éthylène.

Ces phytohormones jouent le rôle de messagers secondaires induisant l'expression de certains facteurs de transcription ; entre autres, la famille des TGAs et les WRKYs qui contrôlent l'expression des gènes de défense (Avanci et al., 2010; Eulgem & Somssich, 2007). L'activation des voies de signalisation et l'accumulation des phytohormones impliquées dans la défense sont en relation étroite avec la nature de l'agent pathogène. L'accumulation de l'AJ et de l'éthylène est associée aux infections causées par des agents pathogènes nécrotrophes ; quant à celle de l'AS, elle est associée aux attaques de pathogènes biotrophes et hémibiotrophes (Glazebrook, 2005).

Ces deux principales phytohormones peuvent agir de façon synergique comme de façon antagoniste, dépendamment de leurs concentrations. À des faibles doses, l'AS et l'AJ ont une activité synergique ; par contre, à des concentrations importantes, ils ont un effet antagoniste qui favorise l'une des deux voies au dépend de l'autre (Fu & Dong, 2013). De plus, à des concentrations importantes, l'éthylène est capable de réprimer la synthèse de l'AS en agissant au niveau de l'expression du gène *ICS1* (*isochorismate synthase1*) qui est

un acteur clé dans la voie de biosynthèse de ce métabolite (H. Chen et al., 2009). De même, le coactivateur NPR1 a été montré crucial dans la modulation du dialogue entre l'AS et l'AJ lors d'une réponse de défense (Spoel et al., 2003).

1.3.2 Voie de l'acide salicylique

Comme décrit précédemment, la régulation de la synthèse et l'accumulation de l'AS est un processus indispensable à la mise en place de la résistance systémique acquise. La synthèse de cette phytohormone emprunte deux voies principales, soient la voie de phénylalanine et la voie de l'isochorismate où les enzymes actives sont respectivement PAL (*Phenylalanine ammonia lyase*) et ICS1 (*Isochorismate synthase 1*) (Wildermuth et al., 2001) (Figure 1.5).

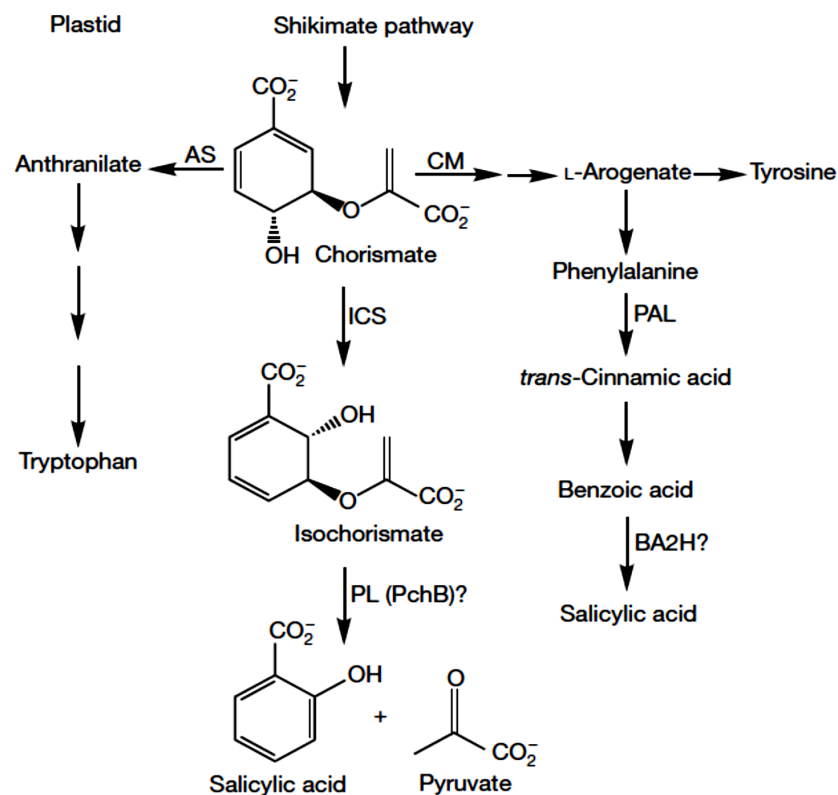


Figure 1.5. Voies de synthèse de l'acide salicylique (Wildermuth et al., 2001).

Lors d'une infection microbienne et la mise en place d'une réponse de défense, chez la plante *Arabidopsis* la voie de l'isochorismate est favorisée pour la synthèse de AS (Wildermuth et al., 2001; Rekhter et al., 2019).

Vue son implication dans la mise en place des réponses défense, la synthèse et l'accumulation de l'AS doivent être régulées. À la suite d'une infection, une partie de l'AS produit est glycosylée et stockée au niveau de la vacuole sous la forme inactive SAG (*Salicylic acid glucoside*) qui sera hydrolysée pour générer de l'AS actif lors d'une infection potentielle. En même temps, une autre partie est prise en charge par une estérase afin de produire le méthyl- salicylate (MeSA) qui a été proposé comme un signal mobile agissant systématiquement lors d'une SAR (Chen et al., 2019).

Le coactivateur NPR1 est une composante essentielle dans la voie de défense dépendante de l'AS. Dans les conditions normales, cette protéine est accumulée au niveau du cytosol sous forme d'oligomères mais au moment où la concentration de l'acide salicylique augmente le NPR1 passe à une conformation monomère et migre vers le noyau. C'est au niveau nucléaire qu'il va interagir avec des facteurs de transcription TGA qui à leur tour activent par exemple l'expression du gène PR1 et ainsi la mise en place des réponses de défense médiées par la voie de l'AS (Fu & Dong, 2013; Spoel et al., 2003). Chez *Arabidopsis thaliana*, on dénombre cinq paralogues du gène NPR1. L'étude de l'activité de ces paralogues a abouti à l'identification du rôle des protéines NPR3 et NPR4 (Moreau et al., 2012) Il a été prouvé que ces dernières représentent des récepteurs de l'acide salicylique et sont capables d'interagir avec NPR1 pour contrôler son niveau d'accumulation en régulant sa dégradation (Fu et al., 2012). Ainsi les protéines NPR3 et NPR4 s'avèrent des régulateurs négatifs de l'immunité chez *Arabidopsis thaliana* (Innes et al., 2018).

En revanche, les deux protéines EDS1 (*Enhanced disease susceptibility 1*) et PAD4 (*Phytoalexin deficient 4*) ont été identifiées comme régulateurs positifs du système de

défense des plantes. Ces protéines lipases influencent l'accumulation de l'acide salicylique et de la protéine PR1 (Tandon et al., 2015).

PAD4 et EDS1 sont capables d'interagir entre elles et cette interaction est importante pour leur fonctionnement. En effet, EDS1 apparaît essentielle pour l'élaboration de la réaction d'hypersensibilité (HR) qui se manifeste par une mort cellulaire programmée au niveau du site de l'infection causant une nécrose qui empêche la propagation du pathogène et initie la mise en place de la résistance. Par ailleurs, la protéine PAD4 contribue au renforcement de cette réponse de défense (Feys et al., 2001; Rietz et al., 2011).

En plus de son rôle primordial dans le déclenchement de la résistance systémique acquise, AS représente un régulateur important dans la voie PTI. En effet, suite à la perception d'un PAMP, la plante est capable d'accumuler localement de l'AS qui va jouer le rôle de messenger secondaire pour délivrer le message extracellulaire en activant entre autres la production de ROS (Xu et al., 2014).

Cette accumulation de l'AS exerce en association avec une protéine de la membrane du réticulum endoplasmique ACD6 (*ACCELERATED CELL DEATH 6*), un rétrocontrôle positif au niveau des PRRs (Tateda et al., 2014). De ce fait, il participe à l'amplification de la réponse de défense en contrôlant l'accumulation et l'expression des protéines réceptrices de PAMPs tels que FLS2 (*Flagellin sensing 2*), EFR (*EF-Tu Receptor*) et CERK1 (*Chitin Elicitor Receptor/LYSM domain receptor-like kinase 1*) (Chika Tateda et al., 2015).

1.4 Phénomène de l'ARN d'interférence

Afin de réguler différents processus biologiques, les plantes ont développé un mécanisme qui met en jeu des petits ARN doubles brins non-codants qui se chargent de moduler l'expression des différents gènes présents au sein des cellules végétales. Ce phénomène se

nomme l'ARN d'interférence ou aussi phénomène de l'extinction génique (Baulcombe, 2004).

Agissant suivant le degré d'homologie entre le petit ARN non-codant et la séquence cible, ce processus interfère soit par clivage ou une inhibition de la traduction. Il peut agir sur des ADN comme sur des ARN, induisant respectivement l'extinction génique transcriptionnelle (TGS : *transcriptional-gene-silencing*) et l'extinction génique post-transcriptionnelle (PSTG : *post transcriptional gene silencing*) (Castel & Martienssen, 2013).

Étant donné qu'il cible aussi bien les acides nucléiques exogène que les acides nucléiques endogène, le phénomène d'ARN d'interférence est un mécanisme très important dans le développement et l'immunité des plantes notamment dans la voie antivirale (Weiberg et al., 2014).

1.4.1 Les petits ARN non-codants

Les plantes possèdent des endoribonucléases appelées Dicer qui sont impliquées dans la biogenèse des petits ARN. Le clivage par une protéine Dicer des longs ARN double brin produit des petits ARN double brin de 20 à 30 nucléotides. Ces petits ARN vont être ensuite pris en charge par un complexe protéique appelé RISC (*RNA-induced silencing complex*) incluant une protéine importante à l'attachement et au fonctionnement appelée argonaute (AGO)(Baulcombe, 2004). Ensuite le complexe RISC incorporant le petit fragment d'ARN guide va achever le processus et chercher les cibles potentielles au niveau de la cellule végétale (Baulcombe, 2004; Borges & Martienssen, 2015). Il existe une diversité de petits ARN non-codants chez les plantes. On en distingue deux principales classes : les siARN (*Small interfering RNA*) regroupant par exemple les tasiARN (*trans-acting siRNA*), les hc-siARN (*heterochromatic-siRNA*) et la classe des miARN (Borges & Martienssen, 2015).

L'origine des petits ARN non-codants peut varier. Elle peut être soit endogène, c'est-à-dire à partir de la transcription des gènes à ARN qui ne codent pas pour la synthèse des protéines et à partir d'autres fragments d'ARN de la même cellule ; soit exogène, à partir d'autres acides nucléiques étrangers (Carthew & Sontheimer, 2009) (Figure 1.6).

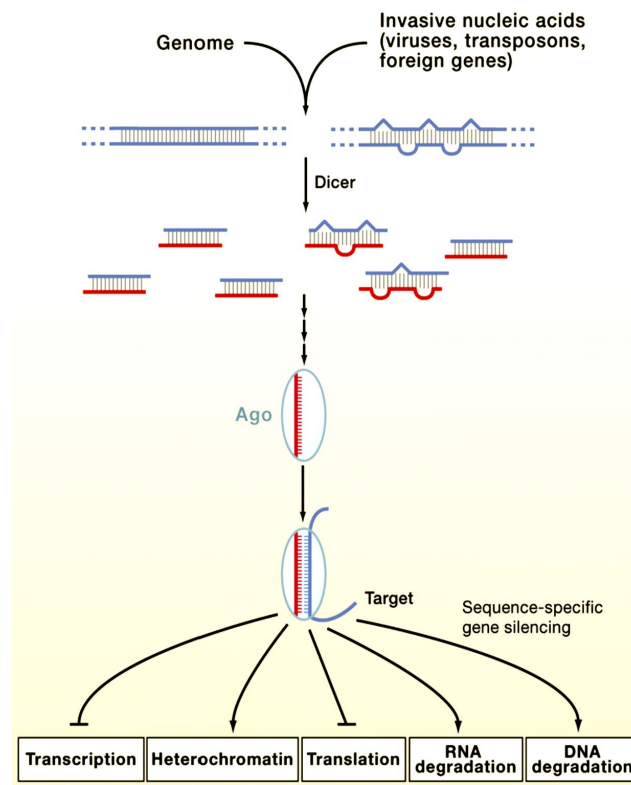


Figure 1.6. Voies et origines des petits ARN non codants chez les plantes (Carthew & Sontheimer, 2009).

1.4.1.1 La voie des miARN

Les microARN (miARN) sont des petits ARN non-codants de 20 à 24 nucléotides. Ils constituent la plus vaste catégorie des petits ARN. Selon la plateforme miRBase, on dénombre plus de 2000 microARN chez l'humain, de 496 microARN chez la souris, de 253 microARN chez *C. elegans* et de 326 microARN chez *A. thaliana*. Ces petits ARN

remplissent le rôle de régulateurs indispensables au bon fonctionnement des différents aspects et processus biologiques des plantes.

1.4.1.2 La découverte des miARN

C'est en 1993, au sein du laboratoire de Victor Ambros que fut faite la découverte des premiers microARN. En étudiant l'expression du gène *lin-4* du *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) qui est un gène régulateur du développement post-embryonnaire chez ce ver, le groupe de chercheurs a constaté que ce dernier ne code pas pour l'expression de la protéine correspondante mais pour la production d'une paire de petits ARN (C. Hartmann et al., 2004; R. C. Lee et al., 1993). Ensuite, en se focalisant sur ce phénomène, ils ont trouvé que les petits ARN qui dérivent du gène *lin-4* possèdent une complémentarité de sens opposé au niveau de la région 3'UTR du transcrit du gène *lin-14*. Cette homologie a engendré une répression de l'expression du gène *lin-14*, induisant la diminution de la production de protéines sans affecter le niveau de l'ARN messager (R. C. Lee et al., 1993). Et depuis, on réfère à ce type de petits ARN régulateurs de microARN (miARN).

1.4.1.3 Biogenèse des miARN

Les miARN sont le produit de la transcription des gènes spécifiques existant au niveau du génome de la cellule eucaryote appelés les gènes MIR. C'est au niveau du noyau que l'ARN polymérase II assure la transcription de ces gènes et la production de miARN primaires (pri-miARN) possédant une coiffe à l'extrémité 5' et une queue polyadénylée à l'extrémité 3' (Zhao et al., 2012). Le pri-miARN se replie ensuite sur lui-même en formant une tige en boucle. L'étape suivante est exécutée par l'endonucléase DICER-LIKE1 (DCL1) qui assure le clivage pour produire en premier temps le précurseur de miARN (pré-miARN), en enlevant la queue polyA et ensuite le duplex miARN*/miARN en se débarrassant de la tige en boucle (Rogers & Chen, 2013). L'accumulation et la maturation des microARN nécessitent une méthylation à l'extrémité 3' médiée par la méthyl-transférase HEN1 (*HUA enhancer 1*). Le miARN mature est ensuite pris en charge par le complexe RISC contenant

l'AGO1 (Argonaute 1) pour aller agir sur ses cibles (Rogers & Chen, 2013; Sanei & Chen, 2015) (Figure 1.7).

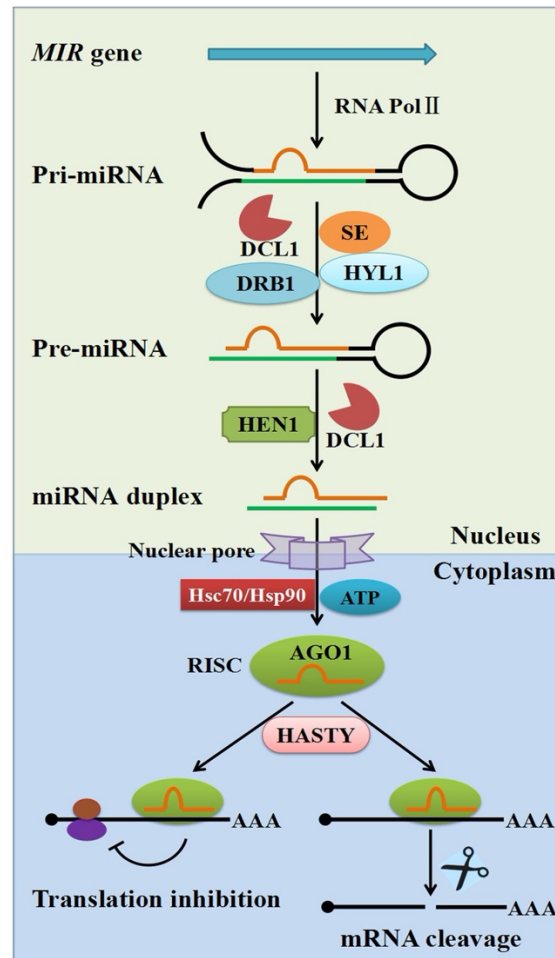


Figure 1.7. Biogenèse des miARN (Liu et al., 2017).

1.4.1.4 Diversité et rôle des miARN

L'abondance des miARN au sein de la cellule végétale a amené plusieurs chercheurs à étudier le rôle de ces petits ARN non-codants chez les plantes. Les recherches ont abouti à identifier des miARN impliqués aussi bien dans le développement que dans l'immunité.

Il a, par exemple, été démontré que le miARN 172 contrôle l'expression du APETAL2 (AP2), un gène régulateur de la floraison chez *Arabidopsis thaliana*. L'accumulation importante du miARN172 a été associée à une organogenèse défectueuse lors de la floraison ; cet effet était similaire à celui observé lors d'une extinction génique de AP2 (X. Chen, 2004).

Impliqué également dans le développement, le miARN164 cible une famille de facteurs de transcription appelée NAC (NAM/ATAF/CUC). Appartenant à cette famille de facteurs de transcription, NAC1 participe à la transmission des signaux de l'auxine, favorisant la rhizogénèse chez *A. thaliana* (Guo et al., 2005).

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que certains miARN sont indispensables à la mise en place d'une réponse immune optimale. On distingue entre autres le miARN160a, le miARN398b et le miARN773 qui participent à l'activation de la voie PTI à la suite de la détection de la flagelline bactérienne (Li et al., 2010).

De même, au niveau de la mise en place de la résistance chez les plantes, différents miARN ont été marqués comme régulateurs des différentes voies de signalisation des phytohormones impliquées dans les réponses de défenses. Par exemple le miARN393, s'accumulant suite à une élicitation par la flg22, il cible les transcrits de TIR/AFB, réprimant ainsi la voie de signalisation de l'auxine afin de favoriser la mise en place de la résistance antibactérienne (Navarro et al., 2006). De plus, le miARN159 est capable de réguler la voie de signalisation de l'acide abscissique (ABA); une phytohormone qui module entre autres la fermeture des stomates suite à un stress biotique; en agissant sur les facteurs de transcription MYB33 et MYB101 et en contrôlant les réponses de défense précoces suite à une infection bactérienne (Zhang et al., 2011).

En outre, une famille de miARN, la famille des miARN482, a été découverte chez la tomate (*Solanum Lycopersicum*). Cette famille regroupe des petits ARN de 22 nucléotides qui

varient au niveau de leurs séquences et contribuent à la régulation de l'accumulation des protéines de résistance. En effet, en réponse à une infection par le virus de la mosaïque de concombre (CMV) ou par *P. syringae*, les protéines de résistance LRR1 et LRR2 chez la tomate s'accumulent suite à l'inhibition du niveau des miARN482 (Shivaprasad et al., 2012).

En faisant l'alignement des séquences de miARN de différentes espèces de plantes et des miARN482, il a été repéré que la séquence du miARN472 d'*Arabidopsis* diffère juste en deux nucléotides au niveau de la position 2 et 14 de celle d'un miARN482 de la tomate (Shivaprasad et al., 2012).

Ensuite, à travers divers travaux de recherche l'implication du miARN472 dans la régulation de la voie PTI ainsi que celle de la voie ETI a été mise en évidence. L'étude des réponses de défense chez les plantes où l'expression de ce miARN est défectueuse a montré que la mutation du miR472 engendre des plantes plus résistantes à *P. syringae* DC3000, de ce fait, ce petit ARN favorise la susceptibilité d'*Arabidopsis thaliana* à cette bactérie (Boccarda et al., 2014). Ce miARN exécute une activité optimale quand il est en association avec la protéine RDR6 (*RNA-Dependant RNA Polymerase 6*) où il module la résistance basale et la résistance spécifique en agissant au niveau des transcrits des gènes de résistance tels que le RPS5. Cette voie de l'ARN d'interférence qui implique miARN472 et la protéine RDR6 régule négativement l'immunité chez la plante d'*Arabidopsis* (Boccarda et al., 2014).

1.4.1.5 Régulation des miARN

En considérant leur importance biologique, la régulation de l'accumulation et de la dégradation des miARN paraît cruciale afin d'assurer le maintien de l'intégrité du tissu végétal.

La conservation d'un niveau stable de miARN peut être contrôlée sur différents niveaux en commençant au niveau transcriptionnel. En agissant au niveau des promoteurs des gènes MIR, des facteurs de transcriptions tels que AtMYC2, ARF, SORLREP3 et LFY sont capables de réguler la transcription des gènes et par conséquent l'accumulation des miARN (Megraw et al., 2006).

Il a été découvert aussi qu'au niveau de la cellule végétale, il existe des séquences endogènes d'ARN non codants qui miment les séquences des cibles de différents miARN appelé '*target mimic*' (TM). En se liant aux petits ARN, ces TM séquestrent les miARN et les empêchent d'aller agir sur les ARN messager en question. Ce phénomène a été décrit comme un régulateur de l'activité des miARN chez les plantes (Wu et al., 2013).

Il existe d'autres phénomènes intrinsèques permettant le contrôle de l'accumulation des miARN au niveau transcriptionnel. Ces mécanismes reposent sur la modification de l'extrémité 3' des miARN. On distingue l'adenylation, l'uridilation et la méthylation des miARN matures.

L'adenylation consiste à ajouter une ou plusieurs adénines aux miARN matures pour ralentir leur dégradation, ce qui confère une sorte de stabilité au miARN (Lu et al., 2009). Quant à l'uridilation, elle consiste à ajouter une ou plusieurs uridine aux miARN matures pour promouvoir leur dégradation (Ren et al., 2012).

Enfin, la méthylation se distingue par l'ajout du groupement méthyl ; ce qui représente un évènement important dans la maturation des miARN mais aussi dans le maintien de leur niveau d'accumulation. En effet, ce phénomène favorise la stabilité des petits ARN et les protège de la dégradation (Zhao et al., 2012), à l'exception de l'activité exonucléique des protéines SDN (*Small RNA degrading nucleases*) qui ont une préférence pour les miARN méthylés et qui interviennent dans le contrôle de leur accumulation (Sanei & Chen, 2015).

1.4.1.6 Les protéines SDN

Les protéines SDN (*Small RNA degrading nucleases*) sont des exonucléases qui ont été identifiées chez la plante modèle *Arabidopsis*. Ces protéines résultent de l'expression de gènes appartenant à une famille multigénique regroupant cinq candidats chez *Arabidopsis thaliana* (Zhao et al., 2012). Trois gènes (SDN1, SDN2 et SDN3) de cette famille ont été caractérisés et leur action sur des miRNA a été étudiée auparavant (Ramachandran & Chen, 2008).

La mutation d'un seul gène de la famille de protéines SDN n'a pas pu affecter le niveau de l'accumulation des miARN par rapport à la lignée sauvage (Ramachandran & Chen, 2008). Cette observation est fortement due à la redondance de l'activité des différents gènes de la même famille. En revanche, l'accumulation de certains miARN notée chez le double mutant *sdn1sdn2* a montré une diminution en comparaison avec les plantes sauvages (Ramachandran & Chen, 2008). Dans la même étude, chez des plantes surexprimant un miARN artificiel qui cible la région exonucléique de 4 gènes de la famille des protéines SDN, l'accumulation de miARN a été compromise (Ramachandran & Chen, 2008). Cependant, ces plantes ont développé un phénotype très sévère présentant des défauts au niveau de différents aspects du développement (Ramachandran & Chen, 2008).

Les protéines SDN sont des exonucléases capables de dégrader les miARN et ont une préférence spécifique pour les miARN méthylés, matures, et simple brin (Sanei & Chen, 2015) (Figure 1.8). Elles peuvent être impliquées dans l'exécution des différents mécanismes biologiques en contrôlant l'homéostasie des miARN au sein de la cellule végétale.

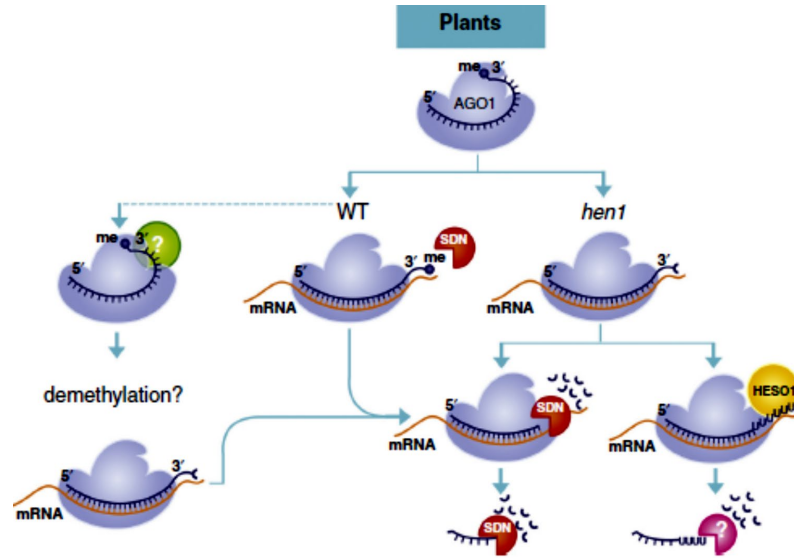


Figure 1.8. Implication des protéines SDN dans le processus de la dégradation des miARN matures et méthylés (Sanei & Chen, 2015).

1.4.1.7 Mouvement des miARN

Lorsqu'ils sont produits, les petits ARN non codants sont capables d'agir et de s'accumuler localement au niveau du site de leur production. Cependant, ils ont montré leur capacité de diffuser au sein du tissu végétal (Mermigka et al., 2016). En se basant sur les résultats obtenus des expériences de greffage réalisées sur *Nicotiana Benthamina* ainsi que sur *Arabidopsis thaliana*, la mobilité des miARN chez les plantes a été prouvée. En effet, miARN399, miARN172 ainsi que miARN395 ont été détectés au niveau du phloème et identifiés comme étant des signaux mobiles (Bhogale et al., 2014; Kasai et al., 2010; Lin et al., 2008; Zou et al., 2018). Ces petits ARN étaient aptes à bouger d'un porte-greffe provenant d'une plante sauvage à un scion défectueux au niveau de la machinerie de la biogenèse de miARN.

La translocation de ces petits ARN peut se faire pour une longue ou courte distance d'une cellule à une autre voisine (Dunoyer et al., 2013). Pour une courte distance, les miARN

peuvent diffuser d'une cellule à une autre via les plasmodesmes jusqu'à un maximum d'environ 15 cellules voisines à partir du site initial de leur accumulation (Dunoyer et al., 2013; Mermigka et al., 2016). Quant au transport de longue distance, ce dernier se fait via les tissus du phloème (Figure 1.9).

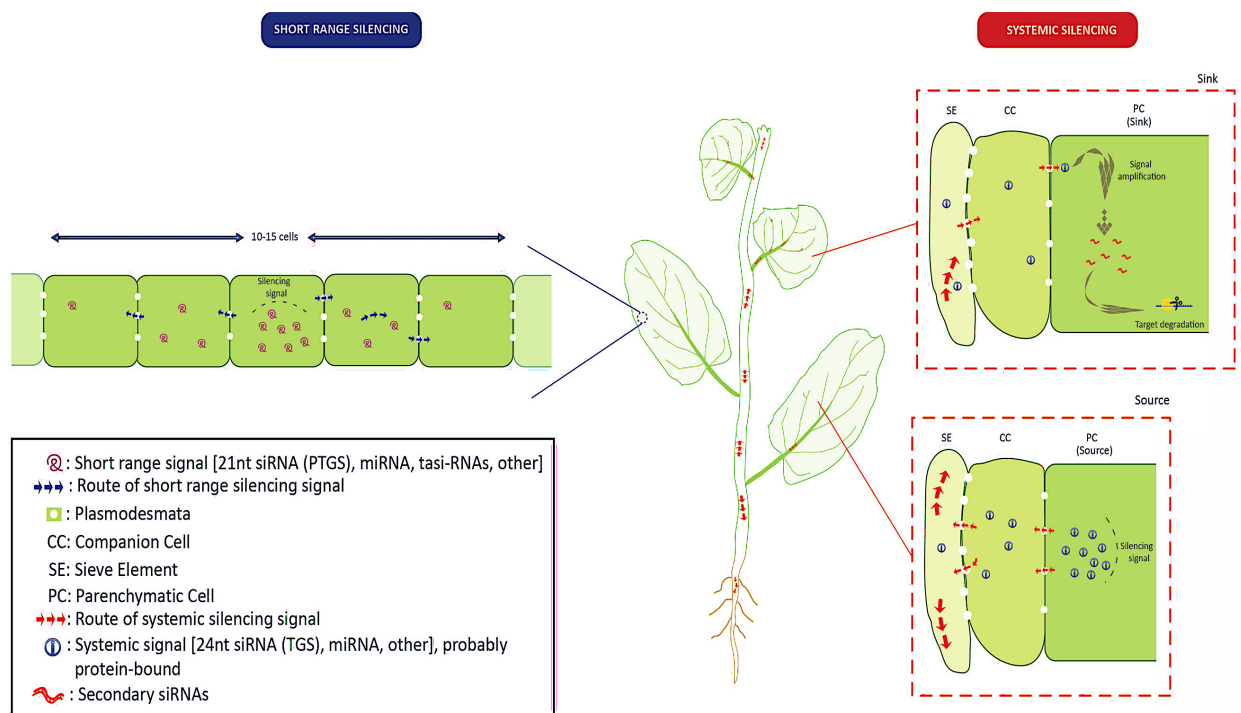


Figure 1.9. Mouvement de courte et longue distance des petits ARN d'interférence au sein des cellules végétales (Mermigka et al. 2016).

1.5 Hypothèse et objectifs du projet de recherche

Les protéines SDN sont des régulateurs de l'homéostasie des miARN chez les plantes (Sanei & Chen, 2015). Ces petits ARN ont été démontrés importants dans la mise en place

de multiples processus biologiques chez les plantes, notamment dans l'immunité (Weiberg et al., 2014).

Dans ce même cadre, le présent projet vient étudier la possibilité de l'implication des protéines SDN dans la mise en place des différentes réponses immunitaires via la régulation de l'homéostasie de certains miARN. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons choisi de travailler avec le double mutant *sdn1sdn2* pour éviter tout effet pléiotropique semblable à celui causé par la surexpression du miARN artificiel.

Ainsi, les principaux objectifs de mon projet de doctorat sont :

1- La mise en évidence du rôle des protéines SDN dans la mise en place de la réponse immunitaire induite par les PAMPs.

2- La mise en évidence de l'importance des protéines SDN dans la mise en place de la résistance systémique.

Aboutir à ces différents objectifs et vérifier l'hypothèse principale qui a été posée vont nous permettre de disséquer le rôle des protéines SDN et les miARN en général dans la mise en place de la voie PTI et de la SAR et ainsi mieux comprendre comment une plante peut faire face aux attaques de différents agresseurs. Ensuite, les résultats qui vont être obtenus pourraient ouvrir des horizons pour trouver des alternatives à l'utilisation des produits chimiques toxiques.

Le système d'étude adopté dans ce projet repose sur l'interaction entre la plante modèle *Arabidopsis thaliana* écotype Colombia-0 et la bactérie gram négatif *Pseudomonas Syringae p.v tomato* DC3000.

Deux manuscrits scientifiques ont été issus des résultats obtenus de ce projet. Chacun des deux articles aborde l'un des deux objectifs décrits précédemment de ce travail de recherche. Ces articles sont présentés dans les parties suivantes de cette thèse.

CHAPITRE 2

IMPLICATION DES PROTÉINES SDN DANS LA MISE EN PLACE DES RÉPONSES DE DÉFENSES CHEZ *ARABIDOPSIS* *THALIANA*

2.1 Préambule

Les plantes ont subi une coévolution continue avec un large éventail d'agents pathogènes contre lesquels elles doivent se défendre. Elles ont donc développé un système immunitaire efficace et spécifique. En tant qu'une réponse immunitaire basale, l'immunité déclenchée par les PAMPs (PTI) peut réduire l'invasion des agents pathogènes et limiter l'infection. Les agents pathogènes arrivent à contourner cette immunité basale par le biais des protéines virulentes spécifiques appelées effecteurs. Ces protéines de virulences sont en retour reconnus par des récepteurs spécifiques chez la plante hôte appelés protéines de résistance, cette reconnaissance induit la réponse immunitaire spécifique appelée ETI (EFFECTOR TRIGGERED IMMUNITY). Les petits ARN, incluant les microARN et les petits ARN d'interférence, remplissent une fonction importante dans de nombreux aspects biologiques vitaux notamment au niveau des interactions plante-microbe. La régulation de l'accumulation et de la dégradation des microARN est contrôlée par des nucléases appelées SDN. La possibilité que le maintien de l'homéostasie des miARN via la régulation exercée par les protéines SDN puisse être cruciale dans le système de défense des plantes reste inconnue. Dans le présent travail, à travers des expériences d'infections avec différentes souches de *Pst* DC3000 et l'élicitation des plantes avec la flg22, nous montrons que SDN1 et SDN2 jouent un rôle essentiel dans l'induction des réponses de défense. Ces exonucléases apparaissent des participants importants à l'activation de la voie de signalisation de l'acide salicylique et aussi dans l'induction de la résistance contre *Pst* DC3000 médiée par flg22 pour la voie PTI et celle médiée par AvrPphB/RPS5 pour la voie

ETI. Ces données soulignent l'importance des protéines SDN en tant que pivot de régulation pour une réponse immunitaire optimale.

Les contributions de chaque auteur dans ce manuscrit sont comme suit :

- K.B, R.A, M.B.D.D et T.A.E.R ont conçu les expériences, analysé et interprété les données.
- R.A a effectué toutes les expériences de la partie de la résistance basale et M.B.D.D et T.A.E.R ont effectué les expériences de la partie de la résistance spécifique.
- K.B a supervisé le projet.
- K.B et R.A ont écrit le manuscrit.

Cet Article est présenté tel qu'il a été soumis dans le journal Pathogens.

2.2 Article

Titre: Involvement of Small RNA Degrading Nucleases in Eliciting Immunity Responses in *Arabidopsis thaliana*

Refka Ajmi¹, Marie Bernadette Dibor Diam¹, Taha Abd El Rahman^{1,2} and Kamal Bouarab^{1,*}

¹ Centre SEVE, Department of Biology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1K 2R1, Canada

² Department of plant Biotechnology, GEBRI, University of Sadat City, Sadat City, P.O.B 79, Egypt

* Corresponding author: Kamal Bouarab

2.2.1 Abstract

Plants have undergone continuous co-evolution with a wide range of pathogens, against which they defend themselves; plants have developed an effective and specific immune system. As a basal immune response, PAMP-triggered immunity (PTI) can reduce and limit infection. Pathogens counter the PTI by specific virulent proteins called effectors. In response to this immunity suppression effect, plants have evolved specific receptors called Resistance proteins, which sense these effectors and induce specific immunity responses called ETI (EFFECTOR-triggered immunity). As small RNAs, microRNAs fulfill an important function in numerous aspects of eukaryote development and host-microbe interactions. MicroRNA homeostasis is controlled by Small RNA Degrading Nucleases (SDN). The possibility that this turnover of miRNA can be crucial in plant immunity remains unknown. Here, through infection experiments using different strains of *Pseudomonas syringae* and elicitation of plants with flg22, we show that SDN1 and SDN2 play an essential role in the set-up of PTI and ETI by activating the salicylic acid signaling

pathway and inducing the resistance against *Pst* DC3000 mediated by flg22 for the PTI pathway and the one mediated by AvrPphB/RPS5 for the ETI pathway. Together, these data highlight the importance of SDN proteins as a regulatory hub for an optimal immune response.

Keywords: Plant immunity; miRNA, small-RNA degrading nucleases; *Arabidopsis thaliana*; *Pseudomonas Syringae*.

2.2.2 Introduction

Vascular plants, like other living organisms, are continually exposed to attacks of different pathogens. Despite the lack of a circulating immune system and a sessile habit, plants are neither easy hosts nor passive organisms. In fact, during a continuous co-evolution with a wide range of pathogens, plants have evolved sophisticated immune systems, which exhibit an impressive capacity for recognizing specific pathogens, followed by suitable immune responses. Pathogen molecular patterns (PAMPs)-triggered immunity (PTI) represents the first line of defense in plant immunity. Basal immunity is based upon the recognition of PAMPs by pattern recognition receptors (PRRs) that are localized on the surface of plant cell membranes [1]. These microbial derived molecules can be proteins, carbohydrates or even lipids citing for exemple a well studied PAMP, the bacterial flagellin which is a subunit of the flagellum of a bacterium. Flagellin or its 22 aa peptide epitope, which is referred to as flg22, is perceived by the plant leucine-rich repeat receptor kinase FLS2 (Flagellin Sensitive 2). This perception of the elicitor induces the interaction of FLS2 with BAK1 (BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1) protein [2], which in turn triggers the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), the induction of immune-responsive genes, callose deposition to reinforce the cell wall, and immunity to a broad spectrum of pathogens[3–5].

The immune responses must be tightly controlled to ensure an optimal magnitude and duration that is sufficient to induce PTI [6]. However, adapted pathogens use several strategies to counteract this basal immunity. Among of these, virulent proteins that are called effectors can be directly injected into the plant cell. These effectors act at different levels of the PTI pathway to suppress this immunity and to promote plant disease [7]. To counter-act the suppression effect that is imposed by effectors, plants have evolved receptors that are called resistance proteins (R proteins), which recognize specific pathogen effector proteins. This leads to the activation of much stronger and faster defence responses that are known as effector-triggered immunity (ETI) [8]. Most plant R proteins belong to

the intracellular nucleotide-binding leucine-rich repeat (coiled coil (CC))-NB-LRR and Toll-interleukin-receptor-like (TIR)-NB-LRR) protein family and bear striking similarities to animal immune receptors [8].

Numerous ETI interaction systems have been described in *Arabidopsis thaliana*. The *Pseudomonas syringae* pv. pisi effector protein, AvrRPS4, is recognized directly by the R protein named RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE 4 (RPS4) [9], while the Avirulence protein of *Pseudomonas phaseolicola* B (AvrPphB) targets the protein Kinase AvrPphB SUSCEPTIBLE1 (PBS1) to activate the RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE 5 (RPS5) R protein [10]. Similarly, the Avirulence protein of *Pseudomonas Maculicola* 1 (AvrRpm1) is able to phosphorylate the intermediate protein RPM1-INTERACTING PROTEIN 4 (RIN4), thereby causing a modification in the conformation leading to the activation of the RESISTANCE TO PSEUDOMONAS MACULICOLA1 (RPM1) R protein [11]. Balancing in the production of phytohormones is crucial for the establishment of various plant defense responses; the plant hormones salicylic acid (SA), ethylene and jasmonic acid are major players in the regulation of signaling networks that are involved in PTI and ETI [12]. To succeed in countering a biotrophic or hemi-biotrophic pathogens in *Arabidopsis* plants, the SA production is prioritized over the other phytohormone and where particularly PATHOGENESIS RELATED PROTEIN1 (PR1) accumulation is considerably induced to mark the activation of this phytohormone biosynthesis and signaling pathways [12].

RNA silencing is a unique eukaryotic process that participates in the control of gene expression. It has been discovered as an antiviral and antimicrobial defense mechanism in eukaryotes [13]. RNA silencing is triggered by double-stranded RNA that is processed by an RNase III-like enzyme, which is called Dicer-like (DCL), into small RNAs (sRNAs) consisting of 21-25 nucleotides [14]. The sRNAs are then incorporated into Argonaute (AGO)-containing RNA-induced Silencing Complexes; these sRNAs are used as guides to bind homologous single-stranded RNA and, in case of extensive sequence complementarity

between the sRNA guide and target, AGO catalyzes the cleavage of the target [14]. MicroRNAs (miRNAs) are types of sRNAs that are encoded by host genes, and which are processed exclusively by DCL1 [15]. They are regulators of gene expression and important controllers of plant development and immunity [16]. Indeed, there are several miRNAs that regulate positively and others that regulate negatively plant development and immunity [17]. Among other microRNAs, we distinguish miR160a, miR398b and miR773. Their actions are important in PTI response following a flagellin treatment, where miR160a was identified as a positive regulator controlling callose deposition upon a bacterial challenge contrarily to what was reported concerning the action of miR398b and miR773 which were shown to be negative regulators in plant defense mechanisms [18, 19]. MiR172b was also identified as a transcriptional controller of the FLS2 receptor through the regulation of TOE1 and TOE2 (TARGET OF EAT1 and 2) transcription factors and, consequently, flagellin perception [5]. The same, miR393 was listed among other essential activators of basal immunity against *Pseudomonas syringae*. This small-non-coding RNA targets TIR/AFB transcripts, which permit the repression of the auxin pathway and promote antibacterial resistance [20]. Another example, miR472, targets mRNAs of disease resistance genes in the coiled-coil nucleotide-binding leucine-rich repeats family, such as RPS5 and RSG1. The overexpression of miR472 suppresses plant immunity [21].

To ensure normal development and optimal immunity, plant endogenous miRNA abundances need to be properly controlled at different levels, including transcription and turnover [16]. Ramachandran and Chen [22] discovered a family of proteins that are called Small RNA degrading nucleases (SDN), which are responsible for maintaining miRNA homeostasis by controlling their degradation. Five members of the SDN family have been reported, but only three have been tested and shown to degrade mature miRNAs, leading to maintenance of their steady level in plant cells [22]. The same study revealed that the abundance of several endogenous miRNAs is affected in *sdn1sdn2* double mutants [22]. SDN1 and SDN2 are able to control miRNA homeostasis [22]. In contrast to the double mutant *sdn1sdn2*, the single mutants *sdn1* and *sdn2* were not affected in the control of

miRNA homeostasis; this response is due to the redundant functioning of these proteins [22]. Given the fact that SDNs control levels of endogenous miRNAs would logically suggest that plants might use these exonucleases to degrade mature miRNAs to ensure effective immunity responses and disease resistance. To test this hypothesis, we used the double mutant *sdn1sdn2* which is a homozygous presenting a reduction of function mutation. Our results demonstrated that SDN1 and SDN2 proteins play an essential role in conferring optimal activation of PTI and ETI in *Arabidopsis thaliana*.

2.2.3 Results

2.2.3.1 *sdn1sdn2* plants are Compromised in FLS2- and RPS5-Mediated Resistance Against *Pst* DC3000 and *Pst* DC3000 expressing AvrPphB, respectively.

Several miRNAs are able to promote disease in plants; this directed us to posit that SDN proteins might be important in activating optimal resistance against pathogens by controlling miRNA, but negatively regulating the activation of plant immunity. To test this hypothesis, we used the double mutant *sdn1sdn2* in our study. We first examined the effects of SDN on the establishment of basal resistance that was mediated by the PAMP flg22. To do so, leaves of 4- to 5-week- old WT, *sdn1sdn2* and *fls2* plants were first, treated with flg22 and 24 h later they were syringe-infected with a virulent strain of *Pseudomonas syringae* pv tomato DC 3000 (*Pst* DC3000) to initiate bacterial growth at 3 days post-infection (dpi) (Figure 1a). The results showed that *fls2* plants do not react to flg22 and are susceptible to *Pst* DC3000; comparable bacterial growth was observed in both the presence and absence of flg22 treatment. In contrast, pre-treated Col-0 plants with flg22 exhibit a less significant bacterial growth compared to mock-treated plants. Mock-treated *sdn1sdn2* plants exhibited numbers of bacteria that were comparable to mock-treated WT *Arabidopsis*. Interestingly, flg22- treated *sdn1sdn2* plants showed greater bacterial numbers than flg22-treated WT plants at 3 dpi. This result suggests that SDN1 and SDN2 contribute

to the activation of resistance that is mediated by flg22 against *Pst* DC3000 in *A. thaliana*. (Figure 2.1a).

So, SDN1 and SDN2 proteins appear important in the establishment of the resistance during PTI. To go more through their role in plant resistance, investigated their eventual involvement in plant resistance mediated by ETI pathway. Therefore, we conducted plant infections with *Pst* DC3000 expressing AvrRps4, AvrPphB and AvrRpm1 effectors, as described in the Material and Methods. Discs from infected leaves were sampled 4 dpi to quantify bacterial numbers.

The bacterial count demonstrated that only AvrPphB-triggered resistance was affected in *sdn1sdn2*-deficient plants compared to WT plants (Figure 2.1b). In contrast to *Pst* DC3000 expressing either AvrRps4 or AvrRpm1, the number of *Pst* DC3000 expressing AvrPphB was significantly higher in *sdn1sdn2* plants compared to WT plants at 4 dpi. Thus, SDN1 and SDN2 are required for the activation of the resistance that is mediated by AvrPphB/RPS5 in the ETI pathway. Together, these results highlight the importance of SDN proteins in the resistance that are activated during both PTI and ETI pathways.

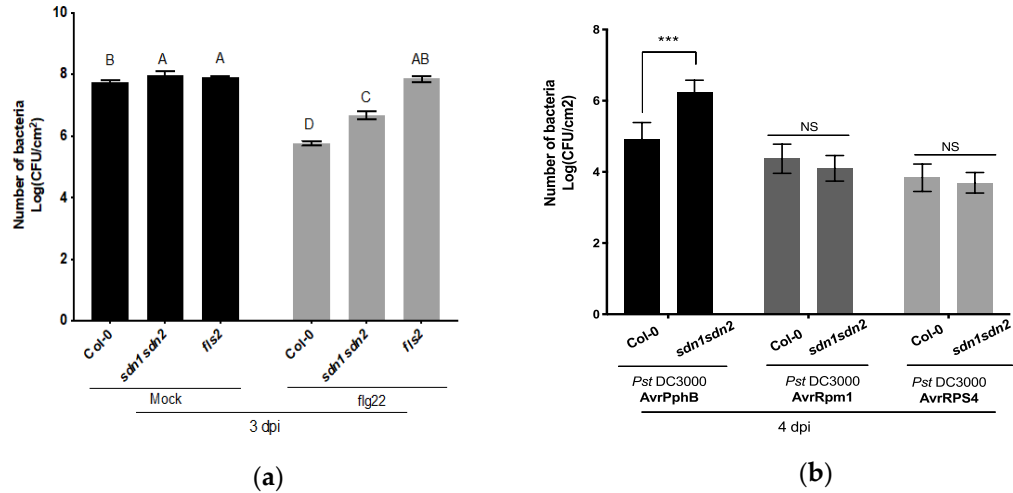


Figure 2.1 *sdn1sdn2* double mutant is compromised in FLS2- and RPS5-mediated resistance against respectively *Pst* DC3000 and *Pst* DC3000 expressing AvrPphB in *Arabidopsis*.

(a) Leaves from 5-week-old Col-0, *sdn1sdn2* and *fls2* plants were treated with 1 μ M flg22 and with sterile water for mock plants. Three discs from three infected leaves were taken at 3 days post-infection (dpi) to estimate the bacterial growth for one individual plant. Data represent the mean of three different plants. Error bars represent the standard deviation (n = 3). Different letters indicate values significantly different according to ANOVA test (n = 3, P < 0.05). **(b)** Leaves from 5-week-old Col-0 and *sdn1sdn2* plants were infected with *Pst* DC3000 bacterial suspensions expressing different effectors AvrPphB, AvrRpm1 and AvrRps4. Three discs from three infected leaves were taken at 4 dpi for bacterial counting. Data represent the mean of three different plants. Error bars represent the standard deviation (n = 3). * indicates values significantly different contrarily to NS (non-significant) according to t-tests where *** P < 0,001.

2.2.3.2 Salicylic Acid Pathway is Affected in *sdn1sdn2* plants

To further explore the importance of SDN proteins in plant immunity, we studied the salicylic acid pathway, which is an important phytohormone in setting-up immune responses that are mediated by the PTI and ETI pathways. Activation of the salicylic acid pathway represents a characteristic component of the immunity response on a biotrophic or hemi-biotrophic pathogen challenge [23]. This pathway is distinguished mainly by the accumulation of the marker protein PR1 [24]. To check whether this pathway is affected in *sdn1sdn2* mutant plants, we studied PR1 protein accumulation. Leaves of 4- to 5- week-old WT, *sdn1sdn2* and *fls2* plants were treated with 1 μ M flg22, and 24 h later, samples were harvested for protein extraction and western blot analysis by using polyclonal PR1 antibodies. Western blot results showed that flg22 treatment induced high accumulations of PR1 in WT plants at 24 hours post-treatment (hpt) compared to 0 hpt (Figure 2a). The *fls2* plants that were used as controls were insensitive to flg22 and showed no accumulation of PR1. Interestingly, the accumulation of PR1 was strongly affected in *sdn1sdn2* plants compared to WT plants at 24 hpt (Figure 2.2a). Thus, SDN1 and SDN2 participate in the activation of PR1 accumulation in response to flg22 in Arabidopsis plants.

We then tested whether the susceptibility phenotype that was observed in *sdn1sdn2* plants against *Pst* DC3000 expressing AvrPphB correlates with the accumulation of PR1. As a control, we used the AvrRpm1/RPM1 ETI system, where resistance against *Pst* DC3000 expressing AvrRpm1 is not affected in *sdn1sdn2* plants at 4 dpi (Figure 2.1b). Leaves of 4- to 5-week-old WT, *sdn1sdn2*, *rps5* (for the *Pst* DC3000 expressing AvrPphB experiment) and *rpm1-3* (for the *Pst* DC3000 expressing AvrRpm1 experiment) plants were syringe-infiltrated with either *Pst* DC3000 expressing AvrPphB or *Pst* DC3000 expressing AvrRpm1; 24 h later, samples were harvested for protein extraction and western blot analysis by using polyclonal PR1 antibodies. Results showed that no accumulation of PR1 was observed in *rps5* and *rpm1-3* in response to the corresponding elicitors. In contrast to *Pst* DC3000 expressing AvrRpm1, *Pst* DC3000 expressing AvrPphB activated lower accumulation of PR1 in *sdn1sdn2* plants compared to WT plants at 24 hpi (Figures 2.2b

and 2.2c). Consequently, the accumulation of PR1 is negatively correlated with the susceptibility phenotype that was observed in *sdn1sdn2* plants during flg22 treatment and *Pst* DC3000 expressing AvrPphB infection in *Arabidopsis*.

We then tested whether salicylic acid accumulation, which controls the accumulation of PR1, is compromised in *sdn1sdn2* plants in response to flg22 treatment and to *Pst* DC3000 expressing AvrPphB infection. Leaves of 4- to 5-week-old WT, *sdn1sdn2*, *rps5* (for the *Pst* DC3000 expressing AvrPphB experiment) and *fls2* (for the flg22 treatment experiment) plants were syringe-infiltrated with either 1 μ M flg22 or *Pst* DC3000 expressing AvrPphB; 24 h later, samples were harvested to quantify salicylic acid accumulation by HPLC-MS. Results that are shown in Figure 3 demonstrated that flg22 and *Pst* DC3000 expressing AvrPphB induced a high accumulation of free salicylic acid in WT plants at 24 hpt compared to 0 hpt. As expected, *fls2* and *rps5* plants did not respond respectively to flg22 and *Pst* DC3000 expressing AvrPphB. The accumulation of free salicylic acid observed in response to flg22 was slightly lower but not significantly affected in *sdn1sdn2* plants compared to WT plants. Due to the remarkable standard deviation obtained between samples this observation cannot give us a sharp conclusion about the involvement of SDN1 and SDN2 proteins in modulating SA accumulation in response to flg22. In contrast to flg22, *Pst* DC3000 expressing AvrPphB induced significant lower accumulations of free salicylic acid in *sdn1sdn2* plants compared to WT plants at 24 hpi (Figure 2.3).

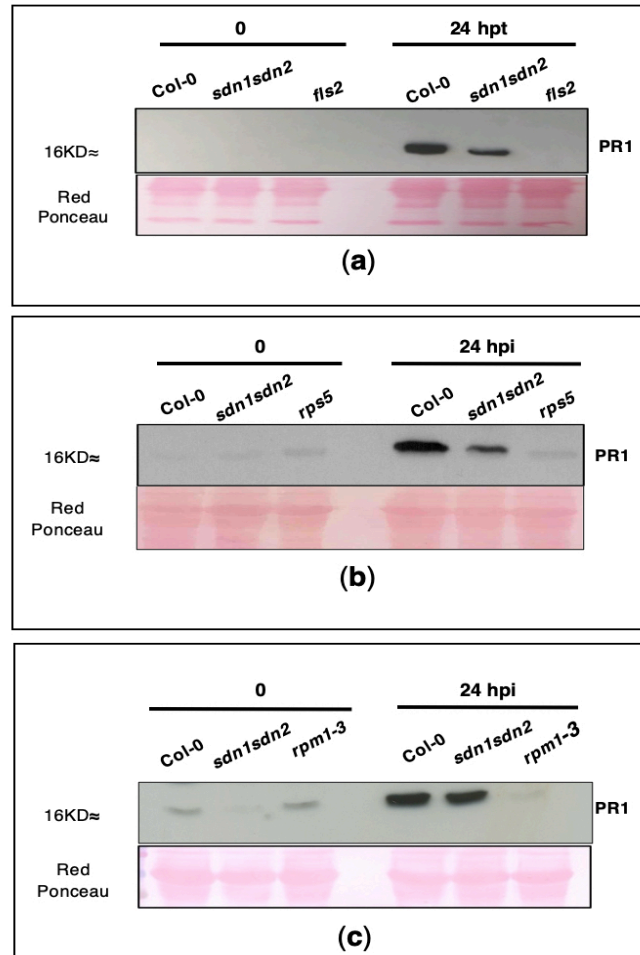


Figure 2.2 The accumulation of PR1 is affected in *sdn1sdn2* plants in response to flg22 treatment and *Pst* DC3000 expressing AvrPphB inoculation.

Western blot showing the accumulation of PR1 protein in leaves of 5-week-old plants upon a treatment with flg22 (a), infection with suspension of *Pst* DC3000 expressing AvrPphB (b) or infection with *Pst* DC3000 expressing AvrRpm1 (c). Samples were collected at 0 and 24 hpt or hpi for total protein extraction and western blot analysis using an anti-PR1 antibody to detect the accumulation of endogenous PR1 protein. The membrane, stained with red Ponceau, serves as an internal control showing that the amounts of deposited proteins are comparable among samples. The experiment was repeated at least three times with similar results.

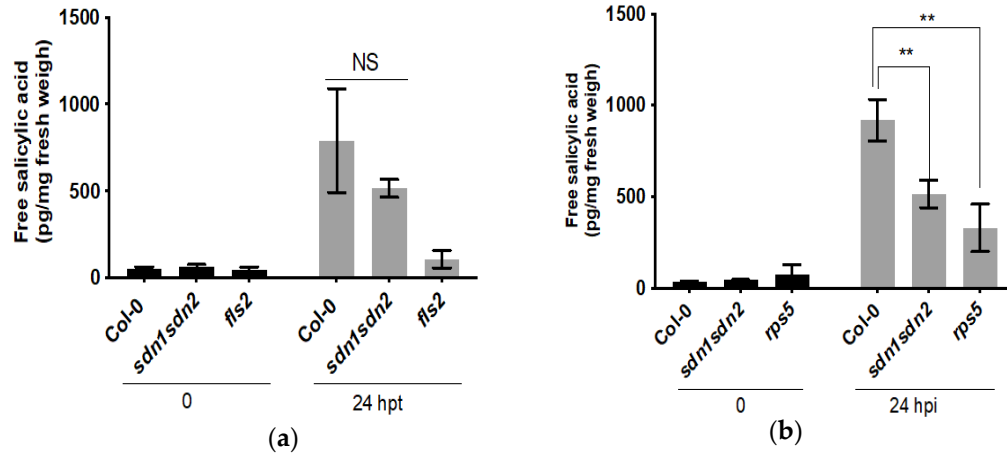


Figure 2.3 Salicylic acid accumulation in response to flg22 treatment and *Pst* DC3000 expressing AvrPphB inoculation in *Arabidopsis*.

Leaves from 5-week-old plants were treated with flg22 (a) or infiltrated with *Pst* DC3000 suspension expressing the effector AvrPphB (b). Samples were collected at 0 and 24 hpt or hpi for salicylic acid quantification using the HPLC-MS method. Error bars are standard deviations (n = 3). ** indicates values significantly different while NS to show statistically non-significant difference according to t-tests ($P < 0.005$). Experiment was repeated at least two times with similar results.

2.2.3.3 SDN1 and SDN2 are not required for the induction of the two marker genes WRKY22 and WRKY29

Upon treatment with flg22, *A. thaliana* plants induced the expression of several genes, including WRKY22 and WRKY29, which represent marker genes of early defence responses that are activated during PTI [25].

Resistance against *Pst* DC3000 and PR1 accumulation mediated by flagellin was compromised in *sdn1sdn2* plants. This response prompted us to investigate whether WRKY22 and WRKY29 are affected in *sdn1sdn2* plants in response to flg22. Consequently, 10-day-old seedlings and 4- to 5-week-old plants were treated with flg22, then samples were harvested at 1 h and 3 h post-treatment (hpt) to quantify expression levels of these two marker genes of early responses.

The qPCR analysis showed flg22 induced expression of both WRKY22 and WRKY29 at 1 and 3 hpt in seedlings and 4- to 5-week-old plants compared to 0 hpt (Figure 2.4). These expression levels did not differ between WT and *sdn1sdn2* seedlings and 4- to 5-week-old plants. As expected, *fls2* seedlings and 4- to 5-week-old plants did not respond to flg22 (Figure 2.4a and 2.4b). Thus, SDN1 and SDN2 did not appear to be required for the expression of these specific genes and might not be involved in the control of early PTI responses unless they control other important actors of early responses. Thus, deeper investigation needs to be conducted to put in evidence the potential essential actors in early responses activated by flg22.

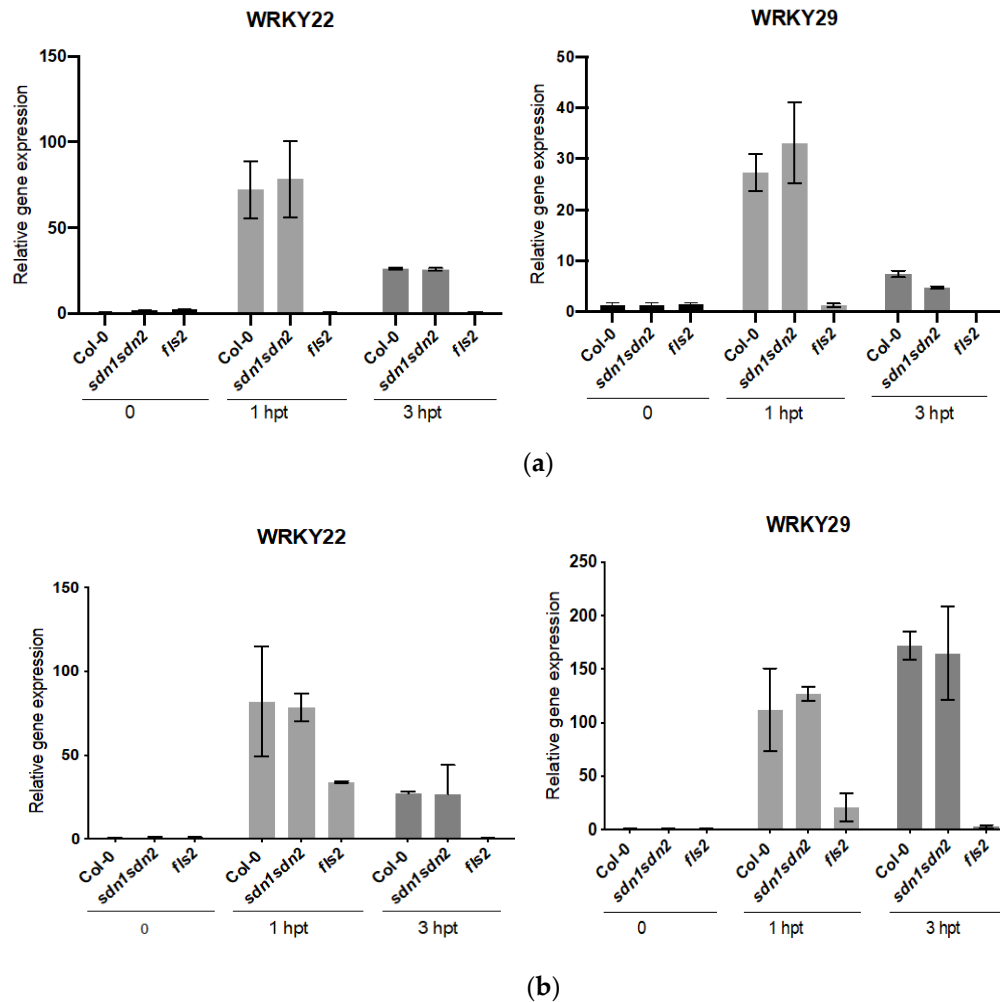


Figure 2.4 Early responses induced by flg22 are not affected in *sdn1sdn2* plants.

10-day-old seedlings (a) and leaves of 5-week-old Col-0, *sdn1sdn2* and *fls2* plants (b) were treated with flg22 and samples were harvested at 0, 1 h and 3 h post-treatment for RNA extraction and qPCR analysis. Expression levels of early markers of PTI, WRKY 29 and 22 were quantified using specific primers described in table 2.1. Error bars showed represent SD calculated from three biological replicates (each biological replicate contains a pool of at least ten plants).

2.2.3.4 Basal Expression Levels of RPS5 and PBS1 Are not Affected in *sdn1sdn2* plants

The fact that only AvrPphB-mediated resistance is affected among ETI systems that were tested, suggests that SDN1 and SDN2 might have an effect at the recognition level of AvrPphB/RPS5-triggered responses. To test this hypothesis, basal levels of expression of the pivotal players in the recognition of AvrPphB, RPS5 and PBS1 were quantified in *sdn1sdn2* plants compared to WT plants. The qPCR analysis that is illustrated in Figure 2.5 clearly showed that expression levels of both RPS5 and PBS1 are comparable between *sdn1sdn2* and WT plants. Therefore, SDN1 and SDN2 do not control basal expression levels of RPS5 and PBS1.

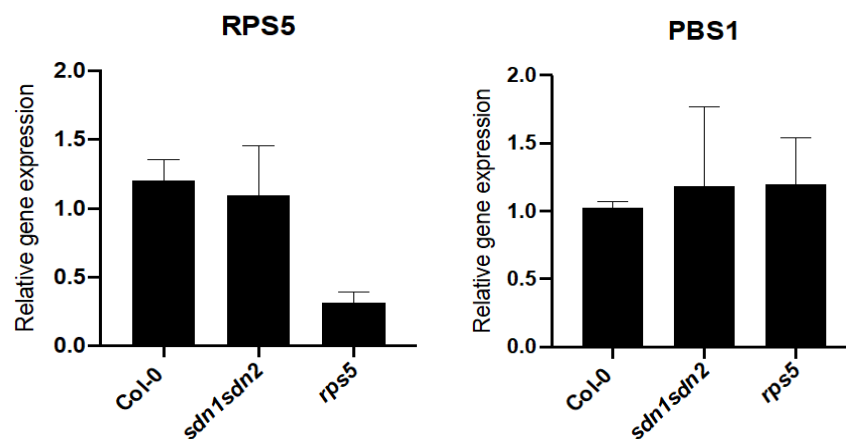


Figure 2.5. Basal levels of RPS5 and PBS1 in *sdn1sdn2* plants.

5-week-old plants of Col-0, *sdn1sdn2* and *rps5* were used to quantify levels of RPS5 and PBS1 transcripts. Samples were used to extract RNA for qPCR analysis using specific primers listed in table 2.1. The error bars are standard deviations of three biological replicates.

2.2.3 Discussion

MiRNAs play crucial roles in plant development and growth, biotic and abiotic responses and cross-kingdom gene regulation [26, 27]. Some progress has been made regarding the function of miRNA in plant immunity and disease resistance [28]. There are miRNAs that are positive and others that are negative regulators of plant immunity and disease resistance. To optimize their biological responses, plants use several strategies to control miRNA stability and turnover, including 3' end modification, AGO association and miRNA-target RNA interaction. Moreover, recent evidence shows that plants also use exoribonucleases to degrade miRNAs leading the control of their homeostasis [29]. SDNs are one of these exoribonucleases. They act as regulators of miRNA homeostasis by controlling their degradation [22, 29, 30]. SDNs act on methylated and unmethylated miRNAs [22, 29]. They act on AGO1- and AGO10-bound miRNAs to cause their 3' truncation, thereby leading to their uridylation and degradation [16]. The role of SDNs and the control of miRNA turnover in the activation of plant immunity is still yet unknown. In this study, we revealed that SDNs are essential for the establishment of efficient resistance that is mediated by flg22- and AvrPphB-triggered immunity pathways. However, resistances that are mediated by AvrRpm1/RPM1 and AvrRps4/RPS4 pathways are not affected in *sdn1sdn2* double mutants in comparison to WT plants. Our work further showed that levels of WRKY29 and WRKY22 transcripts after flg22 treatment were comparable between *sdn1sdn2* and WT plants which implies that some early responses activated by flg22 could not be dependent from SDN1 and SDN2 proteins activity. In the aim to support or reject the fact that SDN1 and SDN2 are not essential for early responses, further investigation should be conducted to desiccate the possible implication of SDN proteins in other early responses induced upon a flagelline perception. We also showed that basal transcript levels of RPS5 and its partner PBS1 are similar in WT and *sdn1sdn2* plants. *Arabidopsis* possesses 5 members belonging to SDN protein family [22]. Given that we are working with the *sdn1sdn2* double mutant, it is possible that the non-affected responses observed in AvrRpm1/RPM1 and AvrRps4/RPS4 systems are eventually due to redundancy in the activity of these proteins.

FLS2 and RPS5 were shown to interact and form a complex in *Arabidopsis* [11, 31]. Potentially, SDNs control common actors that are involved in FLS2- and RPS5-mediated immunity. RNA sequencing analysis that allows the identification of miRNAs controlled by flg22 and AvrPphB through SDNs would be the key experiment that would help dissect how the control of miRNAs turnover participates in the activation of an efficient plant immunity. Overall, this work shows the importance of SDN proteins in basal and highly specific resistance. This research work has enriched our understanding of how plants are capable to protect themselves, while emphasizing new intermediate players in plant immunity.

2.2.4 Material and methods

2.2.4.1 Plant and bacterial materials and growth conditions

The model plant, *Arabidopsis thaliana* was used in this study. We used the wild type plants Columbia-0 (Col-0) and other mutants listed in table 1.

Table 2.1. *Arabidopsis thaliana* mutants used in this study

Mutant	Gene	Mutagen/ Mutation	Genotype	Reference
<i>sdn1sdn2</i>	SDN1, SDN2	T-DNA / Reduction of function	Homozygous,	[22]
<i>fls2</i>	FLS2	T-DNA/ Knock-Out	Homozygous	[32]
<i>rpm1-3</i>	RPM1	Ethylnitrosourea/loss of function	Homozygous	[33]
<i>rps5</i>	RPS5	T-DNA/ reduction of function	Homozygous	[32, 34]

Plants were grown in pots of peat without fertilizers; they were first covered and kept at 4°C to synchronize germination for 48 h, then transferred to the growth chamber. The growth chamber conditions were 23°C during the day and 19°C at night. The photoperiod was 12 hours light/dark and the humidity was at 70%.

Virulent *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 (*Pst* DC3000) and avirulent *Pst* DC3000 expressing either AvrPphB, AvrRpm1 or AvrRps4 strains were grown in KB liquid medium containing an appropriate antibiotic at 28°C. Cultures were centrifuged at 2500 g for 10 min, and bacterial pellets were washed twice and resuspended in 10 mM MgCl₂ for plant inoculation.

2.2.4.2 Flagellin treatment

Flg22 peptide (QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA) was supplied by BIOMATIK company (USA). Leaves of 4- to 5-week-old *Arabidopsis* plants were syringe-infiltrated on the abaxial surfaces with 1 µM flg22 or with sterile water for mock plants, then left to dry and transferred to the growth chamber. These plants were used for protein and RNA extractions, salicylic acid quantification and bacterial inoculation.

Ten-day-old seedlings were used to study early responses and the treatment was performed directly in petri wells by adding flg22 to the liquid MS medium to attain 1 µM of flg22 as the final concentration. These samples were used for RNA extractions.

2.2.4.3 Plant inoculation assays

The bacterial disease assays were performed, as previously described [35, 36]. Four- to 5-week-old *Arabidopsis thaliana* plants were used for inoculation assays and bacterial growth 3 or 4 days post-inoculation (dpi) respectively for basal and specific resistance using serial

dilution plating of ground leaf discs. Each time point represents the mean leaf discs that were taken from three different plants.

Plants that were treated with 1 μ M flg22 were transferred in the growth chamber for 24 h before being syringe-inoculated with 10^5 CFU/mL (OD = 0.0002) of *Pst* DC3000 (approximately 1ml/leaf). Infected plants were covered to maintain humidity and kept in the growth chamber under conditions similar to those described above. Bacterial growth was monitored at 3 dpi using serial dilution plating of ground leaf discs that were homogenized in 10 mM of MgCl₂. Ten μ L was plated from each dilution onto KB solid media containing selective antibiotics. Three plants and three leaves per plant were used for each time point.

Pst DC3000 expressing either AvrRps4, AvrPphB or AvrRpm1 bacterial growth was monitored at 4 dpi. Plants were syringe-inoculated with *Pst* DC3000 expressing either AvrRps4 or AvrPphB or AvrRpm1 effectors at 5×10^5 CFU/mL. Plants were left to dry, then transferred to the growth chamber and kept covered to maintain humidity. Bacterial growth was done by using ground leaf discs as described above.

For western blot and salicylic acid analysis, plant leaves were syringe-infiltrated with 10^7 CFU/mL of avirulent strains, dried at room temperature, covered to maintain high humidity, and transferred to the growth chamber. Samples were harvested 24 hours later for western blots and salicylic acid analysis.

All infection assays were done around 13:00 under the same conditions of plant growth that were described above (photoperiod is started at 8:00).

2.2.4.4 Protein extraction and Western Blot analysis

Total proteins are extracted from 250-300 mg of ground tissue to which we add 200 μ l of extraction buffer. The samples were incubated at 4°C with shaking at 900 rpm for 30 minutes. Samples were next centrifuged at 13500 rpm for 15 min, after which protein concentrations were quantified by using the Bradford method (smart spectrophotometer Tm Plus, BioRad).

Samples, approximately 20 μ g of proteins from each sample, were first prepared for the western blot by adding 4X loading buffer, then incubated at 95°C for 5 min for denaturation. Samples were run and separated on 12 % SDS-PAGE. Proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane. Membrane was first blocked with a blocking solution before being incubated overnight with the anti-PR1 antibody (Cedarlane, Canada) at a concentration of 1/5000. After a series of washings with 1X TBST (Tris-Buffered Saline, 0,1% Tween 20) and milk, the membrane was incubated with the secondary Anti-rabbit antibody (Cedarlane, Canada) at a concentration of 1/12000 for 1 h at room temperature with continuous shaking. Finally, the membrane was washed twice with the blocking solution and three times with 1X TBST before the incubation with the ECL reagent (Clarty Western ECL, Biorad) and the detection procedure.

2.2.4.5 Salicylic acid quantifications

Salicylic acid was extracted from crushed tissues through the addition of 500 μ L of methanol containing 0.01 ng/ μ L of internal standard (D4-Salicylic acid). The samples were then incubated at 4°C for 30 min with end-over-end mixing and the insoluble material was cleared by centrifugation. The supernatant was diluted 10-fold in water and the pH was adjusted to 7 by the addition of 50 mM ammonium acetate. A standard curve containing 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.91, 1.95 or 0.97 μ g/mL SA was prepared in 50 μ L H₂O and processed the same way as the plant samples. For weak anion exchange solid

phase extraction (WAX SPE) of salicylic acid and its internal standard, the protocol was the following: phase conditioning with acetonitrile, washing with 50 mM ammonium acetate, sample loading, washing with 50 mM ammonium acetate, and elution with 5% ammonium hydroxide in water. The eluate was dried down by speed vac then reconstituted in 50 μ L of water containing 0.2% formic acid and 10 mM ammonium formate and processed by LC-MS-MS. Acquisition was performed in negative mode with a ABSciex TripleTOF 5600 (ABSciex, Foster City, CA, USA) that was equipped with an electrospray interface with a 50 μ m iD capillary and coupled to an Eksigent UHPLC (Eksigent, Redwood City, CA, USA). Analyst TF 1.7 software was used to control the instrument and for data processing and acquisition. The source voltage was set to 4.5 kV and maintained at 250°C, curtain gas was set at 29 psi, gas one at 12 PSI and gas two at 11 psi. Acquisition was performed in MRM mode with the following transitions, declustering potential and collision energy: 137.1 \rightarrow 93.05, DP: -80V, CE: -30 for salicylic acid and 141.1 \rightarrow 97.05, DP: -85V, CE: -16V for D4-salicylic acid. Separation was performed on a reversed phase HALO C18 column 0.5 mm i.d., 2.7 μ m particles, 50 mm long (Advance Materials Technology, Wilmington, DE), which was maintained at 50 °C. Samples were injected by loop overfilling into a 5 μ L loop. For the 2.5 min LC gradient, the mobile phase consisted of the following solvent A (0.2% v/v formic acid + 10 mM ammonium formate v/v in water) and solvent B (0.2% v/v formic acid + 10 mM ammonium formate in methanol) at a flow rate of 30 μ L/min. The gradient was the following 0-0.1min hold 5% B, 0.1-1.5 min 5% B to 100% B, 1.4-1.9 min hold 100% B, 1.9-2 min from 100% B to 5% B, 2-2.5 hold 5% B and followed by a 0.2 min post-flush at 30 μ L/min at final condition.

Molecule quantification was done using the area under the curve with MultiQuant software (ABSciex). Some samples were too concentrated; they were diluted and reanalyzed by LC-MS.

2.2.4.6. RNA extraction and qPCR analysis

Total RNA was extracted using the RNeasy extraction KIT (Qiagen), following manufacturer instructions. Then, cDNA synthesis was performed from 2 µg of total RNA using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). The synthesized cDNAs were used for qPCR experiments using the SupergreenTM method following the manufacturer's directives (Wisent Bioproducts) and using specific primers listed in Table 1. The qPCR was performed in the BioRad CFX96 detection system (Bio-Rad) and the amplification program was as follows: 10 min at 95°C followed by 40 cycles alternating between 4 s at 95°C and 4 s at 60°C.

All reactions were run in technical triplicates for each biological replicate (three biological replicates for each treatment). The quantification analysis of target genes was done according to the $\Delta\Delta$ cycle threshold (CT) method and using the elongation factor1 (EF1) as a reference gene. The specific primers for target genes used in this study were synthesized by The Integrated DNA Technologies (IDT Canada, Kanata, ON, Canada).

Table 2.2. Primers used in this study

Gene Name	Locus	Primers sequences
<i>At</i> -EF1	AT5g60390	F: TCTCCGAGTACCCACCTTTG R: TCCTTCTTGTCCACGCTCTT
<i>At</i> -WRKY22	AT4G01250	F: GGAAAGTACGGACAGAAACCC R: GCTCCACTTGTTTACGGGC
<i>At</i> -WRKY29	AT4G23550	F: GCGTAAATACGGGCAGAAAC R: GGTTTGGGTTGGGAAGTTTT
<i>At</i> -RPS5	AT1G12220	F: GGTTGATGATCCGATGGAAGT R: GGGTGACTTCCCAGTGTATTT
<i>At</i> -PBS1	AT5G13160	F: TCAATGTGCATCCAAGAACAGGCG R: AATTTACTTCCCGAGCCACCTCCA

Abbreviations: *At*-EF1: *Arabidopsis thaliana* elongation factor 1; *At*-WRKY: *Arabidopsis thaliana* WRKY transcription factors; *At*-RPS5: *Arabidopsis thaliana* Resistance to *Pseudomonas Syringae* 5, *At*-PBS1 *Arabidopsis thaliana* AvrPphB Susceptible 1

2.2.4.7. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using Statistix 10.0 and Graphpad Prism softwares [34]. Data were subjected to two-way analysis of variance (ANOVA), followed by tukey (HSD) test, or Student's t-test at **P< 0.005 or ***P<0.001.

Author Contributions: Conceptualization, R.A., M.B.D.D., T.A.E.R, and K.B.; Methodology, R.A., M.B.D.D., T.A.E.R, and K.B; Software, R.A., M.B.D.D., T.A.E.R; Validation, R.A., M.B.D.D., T.A.E.R, and K.B; Formal analysis, R.A., M.B.D.D., T.A.E.R, and K.B; Investigation: R.A., and M.B.D.D. ; Resources, K.B.; Data curation, R.A., M.B.D.D., T.A.E.R, and K.B; Writing – Original Draft Preparation, A.R. ; Writing – Review Editing, R.A., M.B.D.D., T.A.E.R, and K.B; Visualization, R.A., M.B.D.D., T.A.E.R, and K.B, Supervision, K.B. ; Project administration, K.B. ; Funding acquisition, K.B.

Funding: This work was supported by the Centre SEVE and NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Discovery Grant).

Acknowledgment: We thank Drs. Darrell Desveaux for providing us with bacterial strains, Xuemei Chen for *sdn1sdn2*, Lionel Navarro for *fls2* and *rps5* and Peter Moffett for *rpm1-3* seeds.

We thank Phenoswitch Bioscience for salicylic acid quantifications using HPLC-MS. A special thanks goes to our laboratory personnel for their invaluable support and help and for Mailys Pinault for initiating some preliminary experiments.

Conflicts of Interest: A.R., M.B.D.D., T.A.E.R., K.B. declare no conflict of interest

2.2.5. References

- [1] Ausubel, F. M. Are Innate Immune Signaling Pathways in Plants and Animals Conserved? *Nat. Immunol.*, **2005**, 6 (10), 973–979. <https://doi.org/10.1038/ni1253>.
- [2] Chinchilla, D. The Arabidopsis Receptor Kinase FLS2 Binds Flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception. *Plant Cell Online*, **2006**, 18 (2), 465–476. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036574>.
- [3] Dodds, P. N.; Rathjen, J. P. Plant Immunity: Towards an Integrated View of Plant–Pathogen Interactions. *Nat. Rev. Genet.*, **2010**, 11 (8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>.
- [4] Jones, J. D. G.; Dangl, J. L. The Plant Immune System. *Nature*, **2006**, 444 (7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>.
- [5] Zou, Y.; Wang, S.; Zhou, Y.; Bai, J.; Huang, G.; Liu, X.; Zhang, Y.; Tang, D.; Lu, D. Transcriptional Regulation of the Immune Receptor FLS2 Controls the Ontogeny of Plant Innate Immunity. *Plant Cell*, **2018**, 30 (11), 2779–2794. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00297>.
- [6] Felix, G.; Duran, J. D.; Volko, S.; Boller, T. Plants Have a Sensitive Perception System for the Most Conserved Domain of Bacterial Flagellin. *Plant J.*, **1999**, 18 (3), 265–276. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.1999.00265.x>.
- [7] Cui, H.; Tsuda, K.; Parker, J. E. Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2015**, 66, 487–511. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040012>.
- [8] Dangl, J. L.; Jones, J. D. G. Defence Responses to Infection. *Nature*, **2001**, 411 (June).
- [9] Sohn, K. H.; Segonzac, C.; Rallapalli, G.; Sarris, P. F.; Woo, J. Y.; Williams, S. J.; Newman, T. E.; Paek, K. H.; Kobe, B.; Jones, J. D. G. The Nuclear Immune Receptor RPS4 Is Required for RRS1SLH1-Dependent Constitutive Defense Activation in Arabidopsis Thaliana. *PLoS Genet.*, **2014**, 10 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004655>.
- [10] Kim, S. H.; Qi, D.; Ashfield, T.; Helm, M.; Innes, R. W. Using Decoys to Expand the Recognition Specificity of a Plant Disease Resistance Protein. *Science (80-.)*, **2016**, 351 (6274), 684–687. <https://doi.org/10.1126/science.aad3436>.

- [11] Zhang, J.; Li, W.; Xiang, T.; Liu, Z.; Laluk, K.; Ding, X.; Zou, Y.; Gao, M.; Zhang, X.; Chen, S.; et al. Receptor-like Cytoplasmic Kinases Integrate Signaling from Multiple Plant Immune Receptors and Are Targeted by a *Pseudomonas Syringae* Effector. *Cell Host Microbe*, **2010**, *7* (4), 290–301. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.03.007>.
- [12] Han, X.; Kahmann, R. Manipulation of Phytohormone Pathways by Effectors of Filamentous Plant Pathogens. *Frontiers in Plant Science*. 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00822>.
- [13] Wang, Q. C.; Nie, Q. H.; Feng, Z. H. RNA Interference: Antiviral Weapon and Beyond. *World Journal of Gastroenterology*. 2003, pp 1657–1661. <https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i8.1657>.
- [14] Staiger, D.; Korneli, C.; Lummer, M.; Navarro, L. Emerging Role for RNA-Based Regulation in Plant Immunity. *New Phytologist*. 2013, pp 394–404. <https://doi.org/10.1111/nph.12022>.
- [15] Carthew, R. W.; Sontheimer, E. J. Origins and Mechanisms of MiRNAs and SiRNAs. *Cell*. Elsevier Inc. 2009, pp 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>.
- [16] Sanei, M.; Chen, X. Mechanisms of MicroRNA Turnover. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2015**, *27*, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.07.008>.
- [17] Ario, M. D.; Grif, S.; Kim, M. Small RNAs : Big Impact on Plant Development. *Trends Plant Sci.*, **2017**, *22* (12), 1056–1068. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.009>.
- [18] Li, Y.; Zhang, Q.; Zhang, J.; Wu, L.; Qi, Y.; Zhou, J. M. Identification of MicroRNAs Involved in Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Plant Innate Immunity. *Plant Physiol.*, **2010**, *152* (4), 2222–2231. <https://doi.org/10.1104/pp.109.151803>.
- [19] Li, Y.; Zhang, Q. Q.; Zhang, J.; Wu, L.; Qi, Y.; Zhou, J. M. Identification of MicroRNAs Involved in Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Plant Innate Immunity. *Plant Physiol.*, **2010**, *152* (4), 2222–2231. <https://doi.org/10.1104/pp.109.151803>.
- [20] Navarro, L.; Dunoyer, P.; Jay, F.; Arnold, B.; Dharmasiri, N.; Estelle, M.; Voinnet, O.; Jones, J. D. G. A Plant MiRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. *Science*, **2006**, *312* (5772), 436–439. <https://doi.org/10.1126/science.1126088>.

- [21] Boccara, M.; Sarazin, A.; Thiébaud, O.; Jay, F.; Voinnet, O.; Navarro, L.; Colot, V. The Arabidopsis MiR472-RDR6 Silencing Pathway Modulates PAMP- and Effector-Triggered Immunity through the Post-Transcriptional Control of Disease Resistance Genes. *PLoS Pathog.*, **2014**, *10* (1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003883>.
- [22] Ramachandran, V.; Chen, X. Degradation of MicroRNAs by a Family of Exoribonucleases in Arabidopsis. *Science*, **2008**, *321* (5895), 1490–1492. <https://doi.org/10.1126/science.1163728>.
- [23] Tsuda, K.; Mine, A.; Bethke, G.; Igarashi, D.; Botanga, C. J.; Tsuda, Y.; Glazebrook, J.; Sato, M.; Katagiri, F. Dual Regulation of Gene Expression Mediated by Extended MAPK Activation and Salicylic Acid Contributes to Robust Innate Immunity in Arabidopsis Thaliana. *PLoS Genet.*, **2013**, *9* (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004015>.
- [24] Wildermuth, M. C.; Dewdney, J.; Wu, G.; Ausubel, F. M. Isochorismate Synthase Is Required to Synthesize Salicylic Acid for Plant Defence. **2001**, *414* (November), 0–4.
- [25] Asai, T.; Tena, G.; Plotnikova, J.; Willmann, M. R.; Chiu, W.-L.; Gomez-Gomez, L.; Boller, T.; Ausubel, F. M.; Sheen, J. MAP Kinase Signalling Cascade in Arabidopsis Innate Immunity. *Nature*, **2002**, *415* (6875), 977–983. <https://doi.org/10.1038/415977a>.
- [26] Gupta, O. P.; Karkute, S. G.; Banerjee, S.; Meena, N. L.; Dahuja, A. Contemporary Understanding of MiRNA-Based Regulation of Secondary Metabolites Biosynthesis in Plants. *Front. Plant Sci.*, **2017**, *8* (March). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00374>.
- [27] Yang, T.; Xue, L.; An, L. Functional Diversity of MiRNA in Plants. *Plant Sci.*, **2007**, *172* (3), 423–432. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.10.009>.
- [28] Weiberg, A.; Wang, M.; Bellinger, M.; Jin, H. Small RNAs: A New Paradigm in Plant-Microbe Interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **2014**, *52* (1), 495–516. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045933>.
- [29] Rogers, K.; Chen, X. Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. *Plant Cell*, **2013**, *25* (7), 2383–2399. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113159>.
- [30] Borges, F.; Martienssen, R. A. The Expanding World of Small RNAs in Plants. *Nat. Publ. Gr.*, **2015**, *16* (12), 1–15. <https://doi.org/10.1038/nrm4085>.

- [31] Qi, Y.; Tsuda, K.; Glazebrook, J.; Katagiri, F. Physical Association of Pattern-Triggered Immunity (PTI) and Effector-Triggered Immunity (ETI) Immune Receptors in Arabidopsis. *Mol. Plant Pathol.*, **2011**, *12* (7), 702–708. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00704.x>.
- [32] Alonso, J. M.; Stepanova, A. N.; Leisse, T. J.; Kim, C. J.; Chen, H.; Shinn, P.; Stevenson, D. K.; Zimmerman, J.; Barajas, P.; Cheuk, R.; et al. Genome-Wide Insertional Mutagenesis of Arabidopsis Thaliana. *Science* (80-.), **2003**, *301* (5633), 653–657. <https://doi.org/10.1126/science.1086391>.
- [33] Mackey, D.; Holt, B. F.; Wiig, A.; Dangel, J. L. RIN4 Interacts with Pseudomonas Syringae Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in Arabidopsis. *Cell*, **2002**, *108* (6), 743–754. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00661-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00661-X).
- [34] Warren, R. F.; Henk, A.; Mowery, P.; Holub, E.; Innes, R. W. A Mutation within the Leucine-Rich Repeat Domain of the Arabidopsis Disease Resistance Gene RPS5 Partially Suppresses Multiple Bacterial and Downy Mildew Resistance Genes. *Plant Cell*, **1998**, *10* (9), 1439–1452. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.9.1439>.
- [35] Katagiri, F.; Thilmony, R.; He, S. Y. The Arabidopsis Thaliana-Pseudomonas Syringae Interaction. *Arab. B.*, **2002**, *1* (1), e0039. <https://doi.org/10.1199/tab.0039>.
- [36] González-Lamothe, R.; El Oirdi, M.; Brisson, N.; Bouarab, K. The Conjugated Auxin Indole-3-Acetic Acid-Aspartic Acid Promotes Plant Disease Development. *Plant Cell*, **2012**, *24* (2), 672–777. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.095190>.

CHAPITRE 3

LES PROTÉINES SDN SONT REQUISES POUR L'ACTIVATION DE LA RÉSISTANCE SYSTÉMIQUE ACQUISE CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*

3.1 Préambule

La résistance systémique acquise (SAR) est une réponse immunitaire induite qui confère aux plantes une capacité impressionnante à répondre aux stress biotiques au niveau des feuilles qui n'ont pas été en contact direct avec un agent pathogène. L'initiation de la SAR dicte aux plantes un changement transcriptionnel important afin de réguler l'expression de certains gènes essentiels pour la réussite de cette réponse. Pour une réponse SAR optimale, les plantes doivent avoir un contrôle strict de la production et de la translocation des signaux mobiles à travers les tissus végétaux et en particulier à travers les plasmodesmes. L'acide salicylique, l'acide pipécolique et l'acide azelaïque sont des acteurs mobiles importants au bon établissement de la SAR. Outre que les métabolites secondaires, les microARN apparaissent comme des régulateurs essentiels de l'immunité des plantes. Leur capacité à se déplacer à travers les tissus végétaux joue en faveur de leur action systémique. Les protéines SDN sont des exonucléases qui contrôlent l'homéostasie des miARN chez *A. thaliana*. Ainsi, le fait que ces protéines soient importantes dans la SAR grâce au contrôle de certains miARN faisait l'hypothèse de ce travail. En réalisant des tests d'infection systémique avec la bactérie *Pst* DC3000 couplées avec des traitements avec la flg22, nous avons démontré que les protéines SDN1 et SDN2 sont cruciales pour la mise en place d'une résistance systémique acquise adéquate en agissant sur les voies de signalisation et de la biosynthèse de l'acide salicylique et de l'acide pipécolique.

Les contributions de chaque auteur dans ce manuscrit sont les suivantes :

- K.B et R.A ont conçu les expériences, analysé et interprété les données.
- R.A a effectué toutes les expériences.
- K.B a supervisé le projet.
- K.B et R.A ont écrit le manuscrit.

3.2 Article

Titre: Small RNA Degrading Nucleases are required for the activation of systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*

R. Ajmi¹ and K. Bouarab^{1*}

¹Centre SEVE, Department of Biology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1K 2R1, Canada

*Corresponding author: Kamal Bouarab

3.2.1 Abstract

Systemic acquired resistance (SAR) is an induced immune response that confers to plants an impressive capacity to respond to biotic stresses in systemic uninfected leaves. Upon local infection, plants are primed to establish the SAR, which gives them the capability of responding rapidly and effectively to an eventual secondary infection. Initiation of SAR, results in an important transcriptional change to regulate the expression of several essential genes. For an optimal SAR response, plants must tightly regulate the production and translocation of mobile signals systemically throughout the plant's tissues, specifically through plasmodesmata. Salicylic acid, pipecolic acid and azelaic acid are important mobile actors in SAR functioning. In addition to the secondary metabolites, small non-coding RNA including microRNA (miRNA) are important components of plant immunity and are able to move through plant tissues and act as systemic signals. Small RNA Degrading Nucleases (SDNs) were identified as regulators of miRNA homeostasis in *Arabidopsis thaliana* plants. The possibility that these proteins could be important in SAR through the control of some important miRNAs was the focus of this study. Through systemic infection with *Pst* DC300 and treatment with flg22 of *Arabidopsis* plants, we were able to show that SDN1 and SDN2 proteins are vital components for maintaining adequate systemic resistance by acting upon salicylic acid and pipecolic acid signaling and biosynthesis pathways.

Keywords: Systemic acquired resistance, miRNA, small RNA degrading nucleases, *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas syringae*.

3.2.2 Introduction

Plants share environments with other more mobile organisms, meaning that they are also exposed to a diverse array of pathogens. Although they cannot move to escape pathogen attacks, plants are not passive participants in these interactions. During their evolution, they succeeded in establishing specific constitutive defenses with which they can defend themselves. Defenses are mounted not only through physical barriers, such as the cuticle and cellular membranes (Walton, 1994), but also by the production of mobile chemical components that inhibit pathogen propagation. Mentioning for example, carbon-based secondary compounds (CBSCs) such as saponins and alkaloids. These compounds are distinguished by their antibacterial and antifungal properties (Jetter & Schäffer, 2001; Wittstock & Gershenzon, 2002). Constitutive defenses are rendered even more effective when plants are able to generate induced responses in the presence of pathogens. Basal and specific defenses are two levels of induced immune response and are generated respectively with the perception of PAMPs (Pathogen associated molecular pattern) to elicit PTI (PAMP triggered immunity) or by effector recognition, which in turn triggers the ETI (effector triggered immunity) response (Dodds & Rathjen, 2010). In addition to these two systems, researchers have succeeded in identifying a unique phenomenon in plant immunity, named Systemic Acquired Resistance (SAR) (Fu & Dong, 2013). In fact, induced resistance allows plants to gain an advantage from the exposure to a primary infection to boost defense mechanisms and to be prepared for secondary subsequent pathogenic attack, where the response is known to be stronger and faster than the primary one (Kachroo & Robin, 2013).

SAR provides plants with broad-spectrum immunity independent from the kind of the initial aggressor. Unlike the ETI response, SAR does not induce programmed cell-death that would restrict pathogen propagation, but provides plants with long-lasting immunity that can be detected in distal leaves for weeks or months and which can be transmitted to the plant's progeny (Luna et al., 2012).

To establish SAR and initiate the transition from growth to defense, plants undergo a wave of transcriptional reprogramming that is coupled with changes in internal amino acid levels observed in response to infection. Such changes have been observed, for example, in the induced expression of some key genes, as NPR1, ICS1 and SARD1, and by the increased production of phenolic compounds (Fu & Dong, 2013; Shah & Zeier, 2013).

In revealing the unique strategy that plants use in SAR defense, several studies had identified compounds that are implicated in this type of immune response. Indeed, SAR relies on the generation and translocation of important signal molecules that are produced locally and which are able to migrate from cell to cell, thereby ensuring systemic action within 4 to 6 hours of an initial infection (Kachroo & Robin, 2013).

The phytohormone salicylic acid (SA) plays a pivotal role in activating the expression of different essential genes in plant resistance (Durrant & Dong, 2004). In *Arabidopsis*, SA accumulates in local and distal leaves upon the detection of a pathogen (Durrant & Dong, 2004; Fu & Dong, 2013). Among other PR proteins (pathogenesis-related protein), PR1 is considered as marker gene indicating the activation of the SA signaling pathway (Betsuyaku et al., 2018). SA can act and accumulate, not only in its initial product form, but also as a conjugated metabolite that can be translocated as a volatile ester, namely, methyl salicylate (MeSA) (Park et al., 2007).

Pipecolic acid is considered as a mobile signal molecule and an important metabolite that has been implicated in the establishment of systemic resistance (Shah & Zeier, 2013). It accumulates both locally and systemically within 12 h of a microbial attack (Bernsdorff et al., 2016; Guerra et al., 2020; Shah & Zeier, 2013). It is a product of L-lysine catabolism, which is processed first by ALD1 (AGD2-Like Defense Response Protein1) and then by SARD4 (SAR Deficient 4) proteins (Shan & He, 2018). FMO1 (Flavin-Dependent Monooxygenase1) is identified as another key participant in the pipecolic acid biosynthesis pathway, which is negatively regulated by SA (Shan & He, 2018; Shine et al., 2019). This

enzyme hydroxylates pipecolic acid to generate NHP (N-hydroxy-pipecolic acid) which is an important mobile regulator of SAR. It acts downstream of pipecolic acid and accumulates in both local and distal leaves following a pathogen attack (Y. C. Chen et al., 2018). NHP also forms part of the feedback loop regulating SA levels (Shah & Zeier, 2013).

In addition to SA and Pip, azelaic acid (AzA) has been demonstrated to be important in SAR establishment (Shah & Zeier, 2013). AzA is a naturally occurring, nine-carbon dicarboxylic acid that accumulates in detectable quantities 24 h after plant infection. AZI1 (Azelaic acid-induced 1) is a marker gene of the AzA signaling pathway and is essential for its systemic accumulation upon the initiation of a biotic stress (Yu et al., 2013). The *azi1* mutant exhibited a defective SAR, while having a normal local response (Jung et al., 2009).

Lastly, G3P (glycerol 3-phosphate) and DA (dehydroabietinal) act as SAR-inducing chemicals. These metabolites are synthesized rapidly following a biotic challenge. They are able to move to uninfected leaves and are considered as important mobile signals (Fu & Dong, 2013). DA works synergistically with AzA, and like G3P and AzA, it requires the apoplastic lipid transfer protein DIR1 (Defective induced resistance 1) to move through plant tissues (Gao et al. 2014).

To be well established, SAR relies upon effective cell to cell communication, together with a long-distance signaling system that allows mobile signals to move through plant tissues and ensure immune response priming (Shah & Zeier, 2013). Translocation of some SAR mediators takes place primarily through the symplast meaning through the cytoplasmic connections where plasmodesmata act as intercellular channels that ensure signal transport to adjacent cells (Lim et al., 2016). The functioning of these structures is tightly controlled in terms of which signals pass. Recent studies have reported that *Arabidopsis* possesses a family of eight plasmodesmata-located proteins (PDLs) (Amari et al., 2010). PDLs are implicated in systemic signal trafficking through the plasmodesmata in particular PDL1

and PDL5 are essential for SAR establishment by modulating PD permeability during an immune response (Lim et al., 2016).

Plants maintain dynamic and efficient immunity through the action of small non-coding RNAs (Weiberg et al., 2014). These special nucleic acids regulate the expression of crucial genes that have been implicated in plant defense (Baulcombe, 2004). miRNAs have been identified as important regulators of plant immunity (Y. Li et al., 2010; Navarro et al., 2006; Shivaprasad et al., 2012). After being produced, these 20 to 22 nt double-stranded RNA are sliced two times by Dicer-Like 1 (DCL1) proteins to produce a miRNA duplex from which one strand will be loaded into an RNA-induced silencing complex (RISC) to proceed with their specific actions on targeted genes, based upon their sequence homologies (Carthew and Sontheimer 2009; Zhao, et al. 2012; Rogers and Chen 2013).

Since the discovery of miRNAs, many of these have been classified as negative and positive regulators. For example, miR160a controls callose deposition during a bacterial challenge (Y. Li et al., 2010). Transcriptional control of the FLS2 receptor was also attributed to the contribution of miR172b, the action of which regulates TOE1 and TOE2 (TARGET OF EAT1 and 2) transcription factors and, as a result, flagelline perception (Zou et al., 2018).

The regulation of miRNA accumulation is considered as an essential mechanism that maintains plant immune responses efficiency. In trying to understand the regulation of miRNA internal stability in *Arabidopsis thaliana*, Ramachandran and Chen (2008) were able to identify a family of specific proteins having exonucleic activity, which are referred to as Small RNA degrading nucleases (SDN) that are able to control miRNA degradation. Only three of five members were tested and demonstrated their capacity to degrade mature miRNAs and, consequently, are able to control their homeostasis (Ramachandran & Chen, 2008). In the same study, a comparison of the abundance of endogenous miRNAs in the *sdn1sdn2* mutant with wild-type plants has confirmed the importance of SDN1 and SDN2

protein activity in maintaining homeostasis of some miRNA levels (Ramachandran & Chen, 2008).

Small non-coding RNAs are not only able to accumulate locally, but are also capable of dispersing through plant tissues to act as systemic signals (Dunoyer et al., 2013). MiRNAs have demonstrated their capacity to translocate from cell to cell in short-range movements through the symplast or apoplast of up to 15 neighboring cells from the initiation site of RNA silencing (Mermigka, et al. 2016). Grafting experiments revealed that miRNAs are also able to spread through the phloem to act systemically, but selectively in distal plant organs (Brosnan et al., 2007). For example, miR399 in *Arabidopsis*, miR156 in tomato and miR176 in tobacco plants were identified as mobile long-distance signals that contribute to post-transcriptional regulation of important genes (Bhogale et al., 2014; Kasai et al., 2010; Lin et al., 2008).

In our previous work, we were able to implicate SDN proteins in the establishment of efficient local plant resistance at basal and specific immunity levels. SDN proteins are essential in maintaining the homeostasis of miRNAs in plant cells and miRNAs are able to spread through plant tissue in a systemic manner. Therefore, we posited that SDN1 and SDN2 proteins could be essential regulators in the establishment of SAR by controlling the accumulation of specific miRNAs. To verify this hypothesis, we compared double mutant *sdn1sdn2* with wild-type plants in the study of systemic resistance. Our results demonstrated that the establishment of an efficient systemic plant resistance depends on the SDN1 and SDN2 protein activities.

3.2.3 Results

3.2.3.1 Systemic resistance flg22-mediated against *Pst* DC3000 is affected in *sdn1sdn2* plants

To express effective resistance when challenged by a pathogen, plants use primary elicitation or infection to prepare their systemic tissues for an eventual secondary attack (Jung et al., 2009). This unique immune response is referred to as Systemic Acquired Resistance (SAR) (Shine et al., 2019).

Our previous research revealed that SDN1 and SDN2 proteins contribute to establishment of the basal immune response that is mediated by flg22. Plant miRNAs are known to move through plant cells (Mermigka, et al. 2016) and tissues; their regulation is governed by SDN protein activity (Sanei & Chen, 2015).

We studied the potential role of these proteins in establishing systemic plant resistance that is mediated by flg22 against *Pst* DC3000. To do so, we compared the double mutant *sdn1sdn2* with WT and *fls2* mutant plants. We started the experiment by syringe-infiltrating three basal leaves of 4- to 5-week-old plants with 4 μ M flg22. Systemic untreated leaves were syringe-infected 48 h later with a virulent strain of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000 (*Pst* DC3000) at 5×10^5 CFU/mL to study bacterial growth 3 days post-infection (dpi) (Figure 3.1).

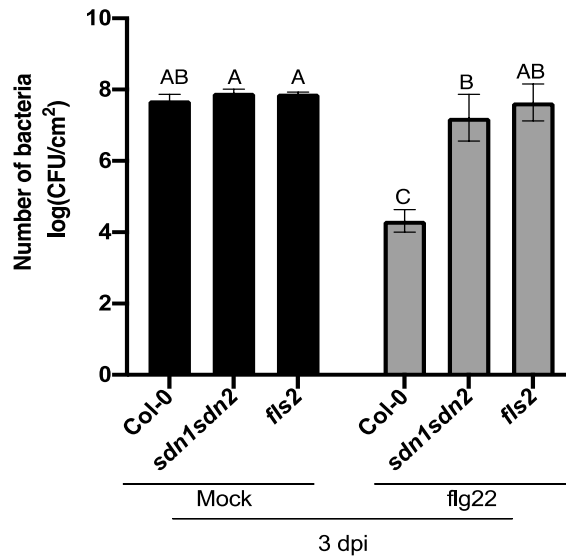


Figure 3.1. *sdn1sdn2* double mutant plants exhibit a defective systemic resistance mediated by flg22 against *Pst* DC3000

Basal leaves from 5-week-old Col-0, *sdn1sdn2* and *fls2* plants were treated with 4 μ M flg22 or with sterile water for mock plants. After 48 h, upper non-treated leaves were infected with 5×10^5 CFU/mL of *Pst* DC3000 suspension. Three discs from three infected leaves were taken at 3 days post-infection (dpi) to assess bacterial colony multiplication for one individual plant. Data represent the mean of three different plants. Error bars represent the standard deviation ($n = 3$). Bacterial growth was analyzed using two-ways ANOVA. Different letters above bars indicate values that significantly differ according to Tukey's HSD test ($P < 0.05$).

Our results showed comparable bacterial growth in mock-treated plants that were from three different plant genotypes (Col-0, *sdn1sdn2* and *fls2*). Responses of these plants were similar to those observed in *fls2* pre-treated plants with flg22, demonstrating the insensitivity to flagelline of this mutant, which serves as a control in our study. In contrast, pre-treated Col-0 plants with flg22 exhibited lower bacterial growth compared to mock-treated plants. Although flagelline pre-treated *sdn1sdn2* plants contained lower numbers of bacteria compared to mock plants, they remained more susceptible to *Pst* DC3000, with

greater bacterial growth compared to flg22-treated WT plants at 3 dpi. This result suggests that SDN1 and SDN2 help in activating systemic resistance in *A. thaliana* that is mediated by flg22 against Pst DC3000.

3.2.3.2 Systemic PR1 gene expression is compromised in *sdn1sdn2* plants

Induction of systemic acquired resistance is linked to the activation of salicylic acid biosynthesis and signaling pathways, which are associated with accumulation of pathogenesis-related proteins, especially PR1 (Durrant & Dong, 2004). Following a pathogen attack, PR1 gene induction is detectable in local and systemic tissues, thereby making it a unique SAR marker gene (Fu & Dong, 2013). We previously observed that systemic resistance mediated by flg22 is impaired in *sdn1sdn2* mutant plants.

So, we wanted next to check if this may be due to a defective SA signaling pathway as observed in our prior research study interested in the local response and where PR1 protein's local accumulation was affected in *sdn1sdn2* in response to flg22 treatment. In order to test this hypothesis, the expression level of PR1 gene was quantified in our research system using WT, *sdn1sdn2* and *fls2* plants. Basal leaves of 4- to 5-week-old plants were syringe-infiltrated with 4µM of flg22 and 48h later, the systemic upper leaves were sampled for PR1 quantification. Analysis of qPCR data shows greater relative expression of PR1 gene in WT compared to *sdn1sdn2* plants (Figure 3.2). The observed difference in expression levels demonstrates that SDN1 and SDN2 proteins are required for induction of PR1 gene expression systemically, thus influencing the SA signaling pathway.

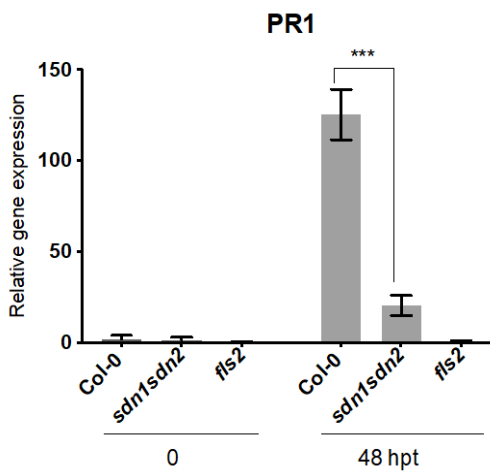


Figure 3.2. SDN1 and SDN2 proteins are essential for the systemic PR1 gene expression induced by flg22

Leaves of 5-week-old Col-0, *sdn1sdn2* and *fls2* plants were treated with 4 μ M flg22. Systemic non-treated leaves were harvested 48h post-treatment (hpt) for RNA extraction and qPCR analysis. Expression levels of PR1 gene were quantified using specific primers described in Supplemental Table 3.S1. Error bars are standard deviations about the means (n = 3). *** indicates values that significantly differ according to student tests (P<0.05). The experiment was repeated at least twice, with similar results.

3.2.3.3 Local activation of the pipecolic acid biosynthesis pathway relies on SDN1 and SDN2 protein, unlike that of Azelaic acid

Over the past two decades, researchers have succeeded in identifying several potential essential actors in the establishment of SAR. Like salicylic acid, azelaic acid (AzA) and pipecolic acid (Pip) are suggested to be important mobile metabolites in the SAR pathway, since they are able to accumulate locally and to be subsequently translocated systemically (Shah & Zeier, 2013; Shine et al., 2019). AZI1 (Azelaic acid induced1) is a key gene in the AzA signaling pathway and an important factor in inducing SAR (Kachroo & Robin,

2013). Similarly, Pip pathway induction has been attributed to the crucial local activation of ALD1, SARD4 and FMO1 gene expression (Shan & He, 2018). To further elucidate the roles of important actors in SAR activation that are under the control of SDN proteins, and which are activated in response to flg22 treatment, we tested the expression of these genes locally following flagelline treatment. Leaves from 4- to 5-week-old WT, *sdn1sdn2* and *fls2* plants were treated with 4 μ M of flg22, then sampled 24 hpt to detect the expression of our candidate genes. The results are summarized in Figure 3.3. The qPCR analysis showed that the expression of AZI1 at 24 hpt in *sdn1sdn2* plants was at levels similar to those observed in WT plants. This response demonstrates that the AzA signaling pathway is unaffected by the absence of SDN1 and SDN2 protein activity. In comparing expression levels in *sdn1sdn2* versus WT plants, a significant difference ($P < 0.05$) was observed in ALD1 and FMO1 gene induction at 24 hpt, but not in SARD4 expression. These results procure an evidence that local activation of the Pip biosynthesis pathway depends on SDN1 and SDN2 proteins.

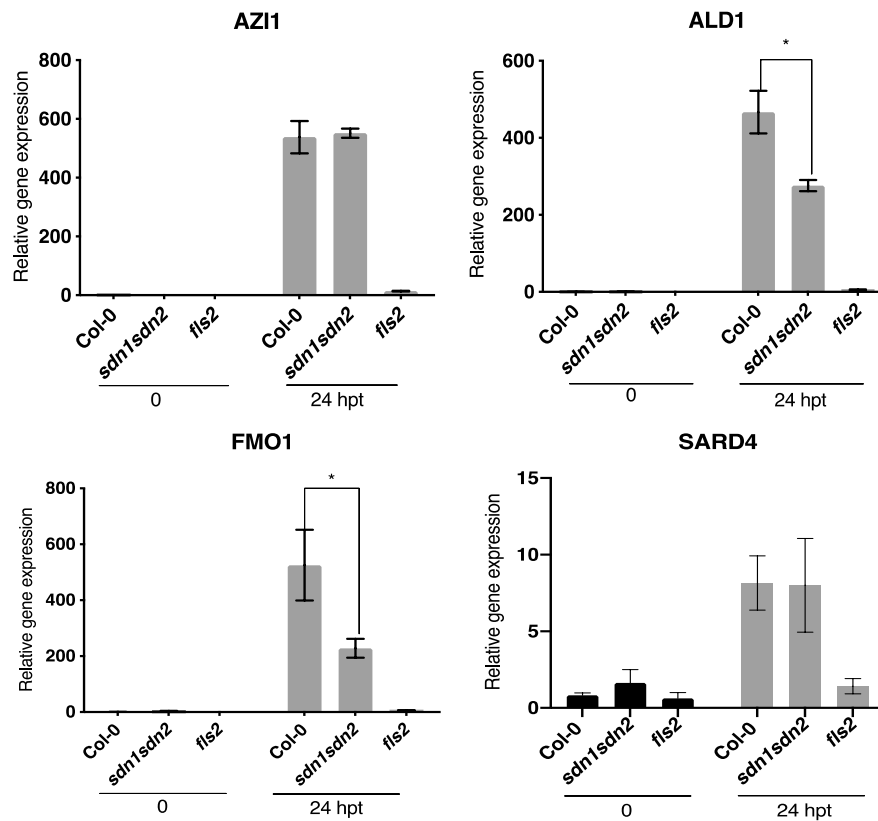


Figure 3.3. SDN proteins are required to induce pipecolic acid biosynthesis in local leaves, but not in the case of azelaic acid

5-week-old Col-0, *sdn1sdn2* and *fls2* plants were treated with 4 μ M flg22, then treated leaves were sampled 24 h post-treatment (hpt) for RNA extraction. Expression levels of targeted genes were quantified by qPCR using specific primers that are described in Supplemental Table 3.S1. Error bars are standard deviations about the means ($n = 3$).

* indicates values that significantly differ according to Student-tests ($P < 0,05$). Results were reproducible in three independent experiments.

3.2.3.4 Pipecolic acid biosynthesis pathway is compromised systemically in *sdn1sdn2* plants

Pipecolic acid represents a critical component of SAR activation (Shan & He, 2018). This metabolite accumulates in systemic tissues in the presence of a pathogen attack. Expression of ALD1, FMO1 and SARD4 is routinely induced, concomitant with the accumulation of Pip (Bernsdorff et al., 2016). According to our previous results in unpublished data yet, the Pip biosynthesis pathway is affected locally in *sdn1sdn2* mutant plants. During further study of Pip biosynthesis in our experimental system, we examined expression of key genes following systemic flagellin treatment. Plants that were 4- to 5-weeks-old, and which belonged to the same genotype (described in Material and Methods), were treated with 4 μ M of flg22 on 3 basal leaves. Three untreated upper leaves that were picked 48 h later were sampled for qPCR analysis. The results are summarized in Figure 3.4. They indicated induction about three times higher in WT plants than was observed in *sdn1sdn2* mutant for ALD1 and FMO1 gene expression. This observation was coupled with comparable transcript accumulation level of SARD4 between Col-0 and plants lacking SDN1 and SDN2 proteins. These results demonstrate clearly that SDN1 and SDN2 proteins play a role in Pip biosynthesis pathway activation in a systemic manner in the presence of flg22.

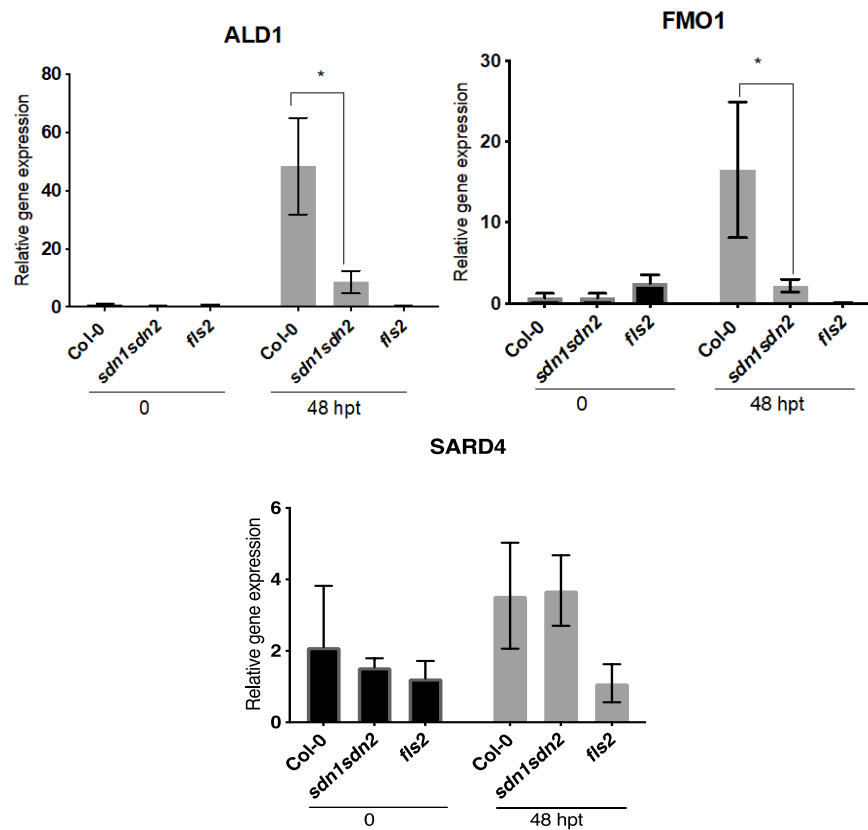


Figure 3.4. Systemic induction of FMO1 and ALD1 gene expression mediated by flg22 depends on SDN1 and SDN2 protein activity

Three basal leaves from 5-week-old Col-0, *sdn1sdn2* and *fls2* plants were treated with 4 μ M flg22. Then, three untreated upper leaves were harvested 48 h post-treatment (hpt) for RNA extraction. Expression levels of the targeted genes were assessed by qPCR using specific primers described in Supplemental Table 3.S1. Error bars are standard deviations about the means (n = 3).

* indicates values that significantly differ, according to Student tests ($P < 0,05$). Results were reproducible in three independent experiments.

3.2.3.5 PDLP5 systemic gene expression is defective in the absence of SDN proteins

In plants, establishment of systemic acquired resistance relies upon adequate cell-to-cell communication facilitating the translocation of important mobile signals that are implicated in resistance (M. Hartmann et al., 2017; Kachroo & Robin, 2013). Plasmodesmata are indispensable in routing mobile signals between plant cells via the symplast (J. Y. Lee, 2015). To regulate the permeability of plasmodesmata, plants produce and accumulate PD-Localizing Proteins (PDLs), especially PDL5. Routing control is exerted through overexpression of PDL5, which leads to a decrease in PD permeability (Lim et al., 2016). To examine possible implications of PDL5 in flagelline-mediated SAR and to determine whether its expression is under the control of SDN proteins, we proceeded with flagelline treatment (4 μ M) of leaves from 4- to 5- week-old Col-0, *sdn1sdn2* and *fls2* plants. Sampling was performed 24 hpt of locally treated leaves and 48 hpt on systemic untreated leaves. Expression of PDL5 was determined by qPCR. Our results (Figure 3.5) showed that local induction of PDL5 gene expression after 24 h is slightly higher in *sdn1sdn2* than in Col-0 plants, but the difference was not statistically significant. This response was the opposite of what was observed in systemic leaves at 48 hpt. In fact, the systemic expression of PDL5 was significantly higher ($P < 0.05$) in WT plants in comparison with plants lacking SDN1 and SDN2 proteins. Thus, we demonstrated that SDNs are essential to PDL5 expression systemically but were unnecessary in local response.

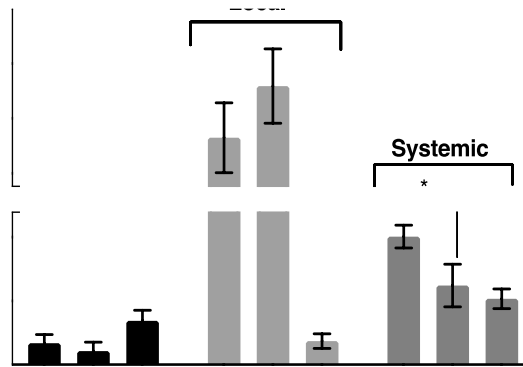


Figure 3.5. SDN proteins control systemic expression of PDLP5 in response to flg22

5-week-old Col-0, *sdn1sdn2* and *fls2* plants were treated with 4 μ M flg22. Then, treated leaves were harvested 24 h post-treatment (hpt) for local experiment. Distal untreated leaves were sampled 48 h for systemic experiment. Samples were subjected to RNA extraction followed by cDNA synthesis. Expression levels of PDLP5 gene were determined by qPCR using specific primers listed in Supplemental Table 3.S1. Error bars are standard deviations between means (n = 3).

* indicates values that significantly differ, according to Student tests ($P < 0,05$). Results were reproducible in three independent experiments.

3.2.4 Discussion and conclusion

Unlike animals, plants do not possess either a circulating immune system or immune memory (Taylor, 1998); rather, they are armed with a specific immune phenomenon that is effective against a wide range of pathogens named systemic acquired resistance (Durrant & Dong, 2004). It is a unique immune response that permits the plant to take advantage of a primary infection to prepare itself to have a faster and powerful response upon secondary pathogenic attacks (Luna et al., 2012). In trying to understand how the plants can have such an effective immune system, researchers succeeded in bringing out the involvement of some plant cell machineries including the RNA interfering phenomenon in plant immunity system. Studies of small non-coding RNA involvement in plant defense identified miRNAs as important modulators in immunity. These molecular regulators must be accumulated in a controlled manner to ensure their proper function. Indeed, plant cells possess specific proteins that are referred to as SDNs, which degrade mature miRNA in a targeted fashion and, consequently, regulate their homeostasis (Ramachandran & Chen, 2008). Through our research, we have previously demonstrated in unpublished data the importance of SDNs in maintaining steady internal levels of miRNA. SDN1 and SDN2 appear particularly important in establishing basal and specific immunity.

In this present study, we focused on possible involvement of SDN proteins in SAR establishment. Here, we showed that systemic resistance mediated by flg22 against *Pst* DC3000 depends upon the presence of SDN1 and SDN2 proteins. Since these exonucleases are responsible for maintaining miRNA homeostasis in *Arabidopsis thaliana* (Zhao et al. 2012; Sanei and Chen 2015), make it logical to think that SDN proteins are important to the establishment of the resistance through the control of some crucial miRNA. Further, in our research we demonstrated what actors were important in establishing SAR and were controlled by SDN proteins. In our system, the SA signaling pathway was affected at the level of systemic PR1 gene expression, given that this gene acts downstream of SA accumulation. Compromised systemic resistance against *Pst* DC3000 could be attributable to inadequate SA action, considering this metabolite as a pivotal component in SAR. Many

recent studies have characterized de novo actors in systemic resistance. Along with SA, plants deploy other metabolites to sucinitiate SAR. Azelaic acid and pipecolic acid both are considered as mobile signals influencing the establishment of SAR (Jung et al., 2009; Shine et al., 2019). In studying several key genes in the biosynthesis and signaling pathways of these metabolites, we demonstrated that only Pip biosynthesis-related genes; ALD1 and FMO1 exhibited defective expression in local and systemic leaves of *sdn1sdn2* plants following flagelline treatment. Although SARD4 is considered a necessary gene in Pip production, Hartmann et al. (2017) successfully demonstrated that *sard4* mutant exhibited less effective basal resistance against *Pst*, while having a comparable induction-degree in systemic resistance compared to WT plants. This finding suggests the existence of subsequent actors that are capable of activating Pip accumulation in a SARD4-independent manner (M. Hartmann et al., 2017). These findings agree with our results, where Pip biosynthesis pathway was affected in plants lacking SDN proteins while maintaining equivalent SARD4 gene expression between *sdn1sdn2* and Col-0 plants in local and systemic leaves. In this project, we looked at the absence of plant miRNA homeostasis that was maintained and controlled by SDN1 and SDN2 proteins during establishment of the SAR response. Since we showed that ALD1 and FMO1 are dependent on SDN proteins activities, we attempted to identify potential miRNAs that could govern the post-transcriptional regulation of these two key genes in pipecolic acid biosynthesis. We relied upon predictions that were made by the psRNATarget server (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/analysis>). According to search results that were obtained from the server, miR418 and miR5028 respectively target ALD1 and FMO1. These two miRNA candidates could be under the control of SDN proteins. If these miRNAs are major players in SAR establishment, their expression under the same study conditions would be an interesting avenue of research to explore in further work.

Pipecolic acid is a vital mobile regulator of SAR and is capable of moving from cell to cell through plasmodesmatal channels (Lim et al., 2016). These properties guided our study of PDL5 expression; PDL5 is a specific protein that accumulated at PD upon a pathogenic challenge. The role of PDL5 was first studied in the context of viral intercellular

movements (Amari et al., 2010) and then for implications of its behavior in plant immunity by regulating PD closure (Shine et al., 2019). Here, our results showed that PDL5 systemic expression is more important in WT plants compared to *sdn1sdn2* plants, which suggests that cell-to-cell communication is not sufficiently regulated to permit optimal movement of plant mobile signals. Interestingly, searches on the aforementioned website (<http://plantgrn.noble.org/psRNA/Target/analysis>) to predict a potential targeting miRNA highlighted miR854. This miRNA could be regulating PDL5 expression in systemic foliage during the imposition of a biotic stress and is under SDN protein control.

Our results demonstrate that SDN1 and SDN2 proteins are essential in plant resistance against *Pst* DC3000; they control pipecolic acid biosynthesis and plasmodesmata trafficking of important SAR signals.

To conclude, we succeeded in determining how important are SDN proteins in *Arabidopsis thaliana* to ensure optimal systemic resistance.

3.2.5 Material and methods

3.2.5.1 Plant and bacterial materials and growth conditions

In this work we used the following plant materials: *Arabidopsis thaliana* wild-type plants Columbia-0 (Col-0); the double mutant of SDN1 and SDN2 (*sdn1sdn2*); and mutant in FLS2 receptor (*fls2*). Plants were grown in peat-pots without fertilizer. We first synchronized their germination by maintaining in dark conditions at 4 °C for 48 h. They were then transferred to the growth chamber under the following conditions: 23 °C day/19 °C night temperatures; a photoperiod of 12 h light/dark; and 70% humidity.

The bacterial culture of the Virulent *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) was maintained on liquid King's B medium containing an appropriate antibiotic at 28 °C, with a 200 rpm shaking overnight. The culture was centrifuged at 2500 g for 10 min, and the bacterial pellet was washed twice and resuspended in 10 mM MgCl₂ for plant inoculation.

3.2.5.2 Flagelline treatment

Flg22 peptide (QRLSTGSRINSKDDAAGLQIA) was supplied by Biomatik company (USA). Leaves of 4- to 5-week-old *Arabidopsis* plants were syringe-infiltrated on the abaxial side with 4 µM flg22 or with sterile water for mock plants, left to air-dry, and then transferred to the growth chamber for 24 h or 48 h for respective sampling of local or systemic leaves. Leaf RNA was extracted for qPCR analysis.

3.2.5.3 Plant inoculation assay

Plants that were treated with 4 µM flg22 at their basal leaves were transferred to the growth chamber for 48 h before being syringe-inoculated with 5x10⁵ CFU/mL (OD = 0.001) of *Pst*

DC3000 (approximately 1mL/leaf). Infected plants were covered to maintain the humidity and kept in the growth chamber under conditions similar to those described above. Bacterial growth was monitored at 3 dpi using serial dilution plating of ground leaf discs that were homogenized in 10 mM of MgCl₂. Ten µL was plated from each dilution in three technical repetitions on KB solid media containing selective antibiotics. Three plants were used for each time point.

Infections were performed around 13:00 under the same conditions of plant growth that are described above (photoperiod begins at 8:00).

3.2.5.4 RNA extraction and qPCR analysis

Total RNA was extracted using the RNeasy extraction KIT from Qiagen, following manufacturer's instructions. Following extraction, cDNA synthesis was performed from 2 µg of total RNA using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). The synthesized cDNA was used for qPCR (quantitative polymerase chain reaction) experiments, using the SupergreenTM method and following manufacturer's directions (Wisent Bioproducts); specific primers are listed in Table 3.1. The qPCR was performed in the BioRad CFX96 detection system (BioRad) and the amplification protocol was as follows: 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles alternating between 4 s at 95°C and 4 s at 60°C.

All reactions were run in technical triplicates for each biological replicate (three biological replicates for each treatment). The quantification analysis of target genes was performed according to the $\Delta\Delta$ cycle threshold (CT) method, using the elongation factor as a reference gene. The specific primers for target genes used in this study were synthesized by The Integrated DNA Technologies (IDT Canada, Kanata, ON, Canada).

3.2.5.4 Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using Minitab and Graphpad Prism softwares. Data were subjected to two-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc tukey (HSD) test, or Student's t-test at $**P < 0.005$ or $***P < 0.001$.

3.2.5.5 Acknowledgments

We thank Drs. Darrell Desveaux, Xuemei Chen, and Lionel Navarro for bacterial strains and seeds. A special thank you goes to our laboratory personnel for their invaluable support and help. This work was supported by the Centre SEVE and NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada).

3.2.5.6 Supplemental Data

Table 3.S1 Primers used in this study

Gene Name	Locus	Primers sequences	Experiment
<i>At</i> -EF1	AT5g60390	F: TCTCCGAGTACCCACCTTTG R: TCCTTCTTGTCCACGCTCTT	qPCR
<i>At</i> -PR1	AT2g14610	F: CTCATACACTCTGGTGGG R: TTGGCACATCCGAGTC	qPCR
<i>At</i> -ALD1	AT2g13810	F: GTGCAAGATCCTACCTTCCCGGC R: CGGTCCTTGGGGTCATAGCCAGA	qPCR
<i>At</i> -FMO1	AT1g19250	F: TCTTCTGCGTGCCGTAGTTTC R: CGCCATTTGACAAGAAGCATA	qPCR
<i>At</i> - SARD4	AT5g52810	F: GTGTTTAAGTCCGTCGGTTCG R: AACGGCTGAGGTAAGTCTCG	qPCR
<i>At</i> - PDLP5	AT1g70690	F: TTCCTTCGTCACCTCAACCG R: GATTGAGCCGTCCGATTGC	qPCR

3.2.6 References

- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., ... Ecker, J. R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301(5633), 653–657.
- Amari, K., Boutant, E., Hofmann, C., Schmitt-Keichinger, C., Fernandez-Calvino, L., Didier, P., Lerich, A., Mutterer, J., Thomas, C. L., Heinlein, M., Mély, Y., Maule, A. J., & Ritzenthaler, C. (2010). A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathogens*, 6(9), 1–10.
- Ario, M. D., Grif, S., & Kim, M. (2017). Small RNAs : Big Impact on Plant Development. *Trends in Plant Science*, 22(12), 1056–1068.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., & Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415(6875), 977–983.
- Ausubel, F. M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology*, 6(10), 973–979.
- Avanci, N. C., Luche, D. D., Goldman, G. H., & Goldman, M. H. (2010). Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 9(1), 484–505.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431(7006), 356–363.
- Ben Rejeb, I., Pastor, V., & Mauch-Mani, B. (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: Molecular mechanisms. *Plants*, 3(4), 458–475.
- Bernsdorff, F., Döring, A. C., Gruner, K., Schuck, S., Bräutigam, A., & Zeier, J. (2016). Pipecolic acid orchestrates plant systemic acquired resistance and defense priming via salicylic acid-dependent and -independent pathways. *The Plant Cell*, 28(1), 102–129.
- Betsuyaku, S., Katou, S., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Nomura, N., & Fukuda, H. (2018). Salicylic Acid and Jasmonic Acid Pathways are Activated in Spatially Different Domains Around the Infection Site During Effector-Triggered Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*, 59(1), 8–16.
- Bhogale, S., Mahajan, A. S., Natarajan, B., Rajabhoj, M., Thulasiram, H. V., & Banerjee, A. K. (2014). MicroRNA156: A potential graft-transmissible microRNA that modulates plant architecture and tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. andigena. *Plant Physiology*, 164(2), 1011–1027.

- Boccardo, M., Sarazin, A., Thiébaud, O., Jay, F., Voinnet, O., Navarro, L., & Colot, V. (2014). The Arabidopsis miR472-RDR6 Silencing Pathway Modulates PAMP- and Effector-Triggered Immunity through the Post-transcriptional Control of Disease Resistance Genes. *PLoS Pathogens*, 10(1).
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379–406.
- Boots, M., & Best, A. (2018). The evolution of constitutive and induced defences to infectious disease. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1883).
- Borges, F., & Martienssen, R. A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Publishing Group*, 16(12), 1–15.
- Brosnan, C. A., Mitter, N., Christie, M., Smith, N. A., Waterhouse, P. M., Carroll, B. J., & Rdr, R. R. N. A. (2007). *Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in Arabidopsis*. 104(37), 1–6.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009a). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642–655.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009b). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. In *Cell* (Vol. 136, Issue 4, pp. 642–655). Elsevier Inc.
- Castel, S. E., & Martienssen, R. a. (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, 14(2), 100–112.
- Cavalier, D. M., Lerouxel, O., Neumetzler, L., Yamauchi, K., Reinecke, A., Freshour, G., Zabolina, O. A., Hahn, M. G., Burgert, I., Pauly, M., Raikhel, N. V., & Keegstra, K. (2008). Disrupting two Arabidopsis thaliana xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. *The Plant Cell*, 20(6), 1519–1537.
- Chang, J. H., Urbach, J. M., Law, T. F., Arnold, L. W., Hu, A., Gombor, S., Grant, S. R., Ausubel, F. M., & Dangl, J. L. (2005). A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7), 2549–2554.
- Chen, H., Xue, L., Chintamanani, S., Germain, H., Lin, H., Cui, H., Cai, R., Zuo, J., Tang, X., Li, X., Guo, H., & Zhou, J.-M. (2009). ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 Repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 Expression to Negatively Regulate Plant Innate Immunity in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(8), 2527–2540.

- Chen, L., Wang, W. S., Wang, T., Meng, X. F., Chen, T. T., Huang, X. X., Li, Y. J., & Hou, B. K. (2019). Methyl salicylate glucosylation regulates plant defense signaling and systemic acquired resistance. *Plant Physiology*, 180(4), 2167–2181.
- Chen, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5666), 2022–2025.
- Chen, Y. C., Holmes, E. C., Rajniak, J., Kim, J. G., Tang, S., Fischer, C. R., Mudgett, M. B., & Sattely, E. S. (2018). N-hydroxy-pipecolic acid is a mobile metabolite that induces systemic disease resistance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(21), E4920–E4929.
- Chinchilla, D. (2006). The Arabidopsis Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception. *The Plant Cell Online*, 18(2), 465–476.
- Chinchilla, Delphine, Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. G., Felix, G., & Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 448(7152), 497–500.
- Cowger, C., & Sutton, A. L. (2005). The Southeastern U . S . Fusarium Head Blight Epidemic of 2003 Plant Health Progress Plant Health Progress. *Plant Health Progress.*, October.
- Cui, H., Tsuda, K., & Parker, J. E. (2015). Effector-triggered immunity: From pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 487–511.
- Dai, X., Zhuang, Z., & Zhao, P. X. (2018). PsRNATarget: A plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W49–W54.
- Dangl, J. L., & Jones, J. D. G. (2001). defence responses to infection. *Nature*, 411(June).
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539–548.
- Dunoyer, P., Melnyk, C., Molnar, A., & Keith Slotkin, R. (2013). Plant mobile small RNAs. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(7), 3–5.
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), 185–209.
- Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., Somerville, S. C., & Voigt, C. A. (2013). Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 161(3), 1433–1444.

- Eulgem, T., & Somssich, I. E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), 366–371.
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S., & Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal*, 18(3), 265–276.
- Feys, B. J., Moisan, L. J., Newman, M. A., & Parker, J. E. (2001). Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO Journal*, 20(19), 5400–5411.
- Fu, Z. Q., & Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, 64(January), 839–863.
- Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S. H., Tada, Y., Zheng, N., & Dong, X. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486(7402), 228–232.
- Gamir, J., Darwiche, R., van't Hof, P., Choudhary, V., Stumpe, M., Schneider, R., & Mauch, F. (2017). The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *Plant Journal*, 89(3), 502–509.
- Gang, D. R., Kasahara, H., Xia, Z. Z.-Q., Mijnsbrugge, K. Vander, Bauw, G., Boerjan, W., Montagu, M. Van, Davin, L. B., Lewis, N. G., Vander Mijnsbrugge, K., Bauw, G., Boerjan, W., Van Montagu, M., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (1999). Evolution of Plant Defense Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 274(11), 7516–7527.
- Gao, Q. M., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2014). Chemical inducers of systemic immunity in plants. *Journal of Experimental Botany*, 65(7), 1849–1855.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 205–227.
- González-Lamothe, R., El Oirdi, M., Brisson, N., & Bouarab, K. (2012). The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. *The Plant Cell*, 24(2), 672–777.
- Guerra, T., Schilling, S., Hake, K., Gorzolka, K., Sylvester, F. P., Conrads, B., Westermann, B., & Romeis, T. (2020). Calcium-dependent protein kinase 5 links calcium signaling with N-hydroxy-L-pipecolic acid- and SARD1-dependent immune memory in systemic acquired resistance. *New Phytologist*, 225(1), 310–325.
- Guo, H.-S. H.-S., Xie, Q., Fei, J.-F., & Chua, N.-H. (2005). MicroRNA Directs mRNA Cleavage of the Transcription Factor NAC1 to Downregulate Auxin Signals for Arabidopsis Lateral Root Development. *The Plant Cell Online*, 17(5), 1376–1386.

- Gupta, O. P., Karkute, S. G., Banerjee, S., Meena, N. L., & Dahuja, A. (2017). Contemporary understanding of miRNA-based regulation of secondary metabolites biosynthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 8(March).
- Han, X., & Kahmann, R. (2019). Manipulation of phytohormone pathways by effectors of filamentous plant pathogens. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10, Issue June).
- Hartmann, C., Corre-Menguy, F., Boualem, A., Jovanovic, M., & Lelandais-Brière, C. (2004). MicroRNAs: A new class of gene expression regulators. *Medecine/Sciences*, 20(10), 894–898.
- Hartmann, M., Kim, D., Bernsdorff, F., Ajami-Rashidi, Z., Scholten, N., Schreiber, S., Zeier, T., Schuck, S., Reichel-Deland, V., & Zeier, J. (2017). Biochemical principles and functional aspects of pipecolic acid biosynthesis in plant immunity. *Plant Physiology*, 174(1), 124–153.
- Innes, R. (2018). The Positives and Negatives of NPR: A Unifying Model for Salicylic Acid Signaling in Plants. *Cell*, 173(6), 1314–1315.
- Jackson, R. D. (1986). Remote Sensing of Biotic and abiotic plant stress. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 24(92), 265–287.
- Jetter, R., & Schäffer, S. (2001). Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiology*, 126(4), 1725–1737.
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., & Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO Journal*, 19(15), 4004–4014.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329.
- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., & Greenberg, J. T. (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science*, 324(5923), 89–91.
- Kachroo, A., & Robin, G. P. (2013). Systemic signaling during plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(4), 527–533.
- Kasai, A., Kanehira, A., & Harada, T. (2010). miR172 Can Move Long Distances in *Nicotiana benthamiana*. *The Open Plant Science Journal*, 4(1), 1–7.
- Katagiri, F., Thilmony, R., & He, S. Y. (2002). The Arabidopsis Thaliana-Pseudomonas Syringae Interaction. *The Arabidopsis Book*, 1(1), e0039.

- Kim, C. Y., & Zhang, S. (2004). Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant Journal*, 38(1), 142–151.
- Kim, S. H., Qi, D., Ashfield, T., Helm, M., & Innes, R. W. (2016). Using decoys to expand the recognition specificity of a plant disease resistance protein. *Science*, 351(6274), 684–687.
- Lamichhane, J. R., Varvaro, L., Parisi, L., Audergon, J. M., & Morris, C. E. (2014). Disease and frost damage of woody plants caused by *Pseudomonas syringae*: Seeing the forest for the trees. In *Advances in Agronomy* (Vol. 126). Elsevier.
- Lebailly, P., Niez, E., & Baldi, I. (2007). Données épidémiologiques sur le lien entre cancers et pesticides. *Oncologie*, 9(5), 361–369.
- Lee, J. Y. (2015). Plasmodesmata: A signaling hub at the cellular boundary. *Current Opinion in Plant Biology*, 27, 133–140.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854.
- Li, Y., Zhang, Q., Zhang, J., Wu, L., Qi, Y., & Zhou, J. M. (2010). Identification of MicroRNAs Involved in Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Plant Innate Immunity. *Plant Physiology*, 152(4), 2222–2231.
- Li, Yan, Zhang, Q. Q., Zhang, J., Wu, L., Qi, Y., & Zhou, J. M. (2010). Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. *Plant Physiology*, 152(4), 2222–2231.
- Lim, G. H., Shine, M. B., De Lorenzo, L., Yu, K., Cui, W., Navarre, D., Hunt, A. G., Lee, J. Y., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2016). Plasmodesmata Localizing Proteins Regulate Transport and Signaling during Systemic Acquired Immunity in Plants. *Cell Host and Microbe*, 19(4), 541–549.
- Lin, S. I., Chiang, S. F., Lin, W. Y., Chen, J. W., Tseng, C. Y., Wu, P. C., & Chiou, T. J. (2008). Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiology*, 147(2), 732–746.
- Liu, S. R., Zhou, J. J., Hu, C. G., Wei, C. L., & Zhang, J. Z. (2017). MicroRNA-mediated gene silencing in plant defense and viral counter-defense. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01801>
- Lu, S., Sun, Y. H., & Chiang, V. L. (2009). Adenylation of plant miRNAs. *Nucleic Acids Research*, 37(6), 1878–1885.

- Luna, E., Bruce, T. J. A., Roberts, M. R., Flors, V., & Ton, J. (2012). Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiology*, 158(2), 844–853. <https://doi.org/10.1104/pp.111.187468>
- Mackey, D., Holt, B. F., Wiig, A., & Dangl, J. L. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell*, 108(6), 743–754.
- Mann, D. D., Buening, G. M., Osweiler, G. D., & Hook, B. S. (1984). Effect of subclinical levels of T-2 toxin on the bovine cellular immune system. *Canadian Journal of Comparative Medicine. Revue Canadienne de Médecine Comparée*, 48(3), 308–312.
- Mcmullen, M., Jones, R., Gallenberg, D., & America, S. (1997). Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 81(12).
- Megraw, M., Baev, V., Rusinov, V., Jensen, S. T., Kalantidis, K., & Hatzigeorgiou, A. G. (2006). MicroRNA promoter element discovery in *Arabidopsis*. *RNA (New York, N.Y.)*, 12(9), 1612–1619.
- Mermigka, G., Verret, F., & Kalantidis, K. (2016a). RNA silencing movement in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(4), 328–342.
- Mermigka, G., Verret, F., & Kalantidis, K. (2016b). RNA silencing movement in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(4), 328–342.
- Moreau, M., Tian, M., & Klessig, D. F. (2012). Salicylic acid binds NPR3 and NPR4 to regulate NPR1-dependent defense responses. *Cell Research*, 22(12), 1631–1633.
- Morris, C. E., & Moury, B. (2019). Revisiting the Concept of Host Range of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 57(1), 63–90.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., & Jones, J. D. G. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5772), 436–439.
- Osbourn, A. (1996). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *The Plant Cell*, 8(10), 1821–1831. h
- Park, S.-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., & Klessig, D. F. (2007). Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5847), 113–116.
- Pereira, A. (2016). Plant abiotic stress challenges from the changing environment. *Frontiers in Plant Science*, 7(JULY2016), 2013–2015.

- Pernezny, K., Elliott, M., Palmateer, A., & Havranek, N. (2014). *Guidelines for Identification and Management of Plant Disease Problems : Part II . Diagnosing Plant Diseases Caused by Fungi , Bacteria and Viruses I.*
- Qi, Y., Tsuda, K., Glazebrook, J., & Katagiri, F. (2011). Physical association of pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) immune receptors in Arabidopsis. *Molecular Plant Pathology*, 12(7), 702–708.
- Ramachandran, V., & Chen, X. (2008). Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5895), 1490–1492.
- Rekhter, D., Lüdke, D., Ding, Y., Feussner, K., Zienkiewicz, K., Lipka, V., Wiermer, M., Zhang, Y., & Feussner, I. (2019). Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid. *Science*, 365(6452), 498–502.
- Ren, G., Chen, X., & Yu, B. (2012). Uridylation of miRNAs by HEN1 SUPPRESSOR1 in arabidopsis. *Current Biology*, 22(8), 695–700.
- Rietz, S., Stamm, A., Malonek, S., Wagner, S., Becker, D., Medina-Escobar, N., Corina Vlot, A., Feys, B. J., Niefind, K., & Parker, J. E. (2011). Different roles of Enhanced Disease Susceptibility1 (EDS1) bound to and dissociated from Phytoalexin Deficient4 (PAD4) in Arabidopsis immunity. *New Phytologist*, 191(1), 107–119.
- Robert-Seilanianantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. G. (2011). Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 317–343.
- Rogers, K., & Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell*, 25(7), 2383–2399.
- Rosebrock, T. R., Zeng, L., Brady, J. J., Abramovitch, R. B., Xiao, F., & Martin, G. B. (2007). A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature*, 448(7151), 370–374.
- Sanei, M., & Chen, X. (2015). Mechanisms of microRNA turnover. *Current Opinion in Plant Biology*, 27, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.07.008>
- Schulze-Lefert, P., & Robatzek, S. (2006). Plant Pathogens Trick Guard Cells into Opening the Gates. *Cell*, 126(5), 831–834.
- Schweizer, P., Felix, G., Buchala, A., Müller, C., & Métraux, J. P. (1996). Perception of free cutin monomers by plant cells. In *Plant Journal* (Vol. 10, Issue 2, pp. 331–341).
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M. A., Cammue, B. P. A., & De Bolle, M. F. C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(11), 941–950.

- Shah, J., & Zeier, J. (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 4(February), 1–16.
- Shan, L., & He, P. (2018). Pipped at the Post: Pipecolic Acid Derivative Identified as SAR Regulator. *Cell*, 173(2), 286–287.
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S. C., Martin, G. B., Sheen, J., Morgenstette, D., & Tübingen, D.-. (2008). Bacterial Effectors Target the Common Signaling Partner BAK1 to Disrupt Multiple MAMP Receptor-Signaling Complexes and Impede Plant Immunity. *Cell Host and Microbe*, 4(1), 17–27.
- Shine, M. B., Xiao, X., Kachroo, P., & Kachroo, A. (2019). Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant Science*, 279(December 2017), 81–86. h
- Shivaprasad, P. V., Chen, H., Patel, K., Bond, D. M., Santos, B. A. C. M., & Baulcombe, D. C. (2012). A MicroRNA Superfamily Regulates Nucleotide Binding Site – Leucine-Rich Repeats and Other mRNAs. *The Plant Cell*, 24(March), 859–874.
- Smith, J. M., Heese, A., Dodds, P., Rathjen, J., Boller, T., Felix, G., Monaghan, J., Zipfel, C., Boller, T., He, S., Lindeberg, M., Cunnac, S., Collmer, A., Xin, X.-F., He, S., Munkvold, K., Martin, G., Mansfield, J., Newman, M.-A., ... Chinchilla, D. (2014). Rapid bioassay to measure early reactive oxygen species production in Arabidopsis leaf tissue in response to living *Pseudomonas syringae*. *Plant Methods*, 10(1), 6.
- Sohn, K. H., Segonzac, C., Rallapalli, G., Sarris, P. F., Woo, J. Y., Williams, S. J., Newman, T. E., Paek, K. H., Kobe, B., & Jones, J. D. G. (2014). The Nuclear Immune Receptor RPS4 Is Required for RRS1SLH1-Dependent Constitutive Defense Activation in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genetics*, 10(10).
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., Pelt, J. A. Van, Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., Loon, L. C. Van, Dong, X., & Pieterse, C. M. J. (2003). NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate-and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *The Plant Cell*, 15(March), 760–770.
- Staiger, D., Korneli, C., Lummer, M., & Navarro, L. (2013). Emerging role for RNA-based regulation in plant immunity. In *New Phytologist* (Vol. 197, Issue 2, pp. 394–404).
- Suh, M., Samuels, A., & Jetter, R. (2005). Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in Arabidopsis stem epidermis. *Plant Physiology*, 139(December), 1649–1665.

- Tandon, G., Jaiswal, S., Iquebal, M. a., Kumar, S., Kaur, S., Rai, A., & Kumar, D. (2015). Evidence of salicylic acid pathway with EDS1 and PAD4 proteins by molecular dynamics simulation for grape improvement. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 33(September), 1–12.
- Tateda, C., Zhang, Z., Shrestha, J., Jelenska, J., Chinchilla, D., & Greenberg, J. T. (2014). Salicylic Acid Regulates Arabidopsis Microbial Pattern Receptor Kinase Levels and Signaling. *The Plant Cell*, 26(10), 4171–4187.
- Tateda, Chika, Zhang, Z., & Greenberg, J. T. (2015). Linking pattern recognition and salicylic acid responses in Arabidopsis through ACCELERATED CELL DEATH6 and receptors. *Plant Signaling & Behavior*, 10(10), e1010912.
- Taylor, C. B. (1998). Defense responses in plants and animals--more of the same. *The Plant Cell*, 10(6), 873–876.
- Tekauz, A., McCallum, B., & Gilbert, J. (2000). Review: Fusarium head blight of barley in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22(1), 9–16.
- Tsuda, K., Mine, A., Bethke, G., Igarashi, D., Botanga, C. J., Tsuda, Y., Glazebrook, J., Sato, M., & Katagiri, F. (2013). Dual Regulation of Gene Expression Mediated by Extended MAPK Activation and Salicylic Acid Contributes to Robust Innate Immunity in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genetics*, 9(12).
- Tsuji, J., Jackson, E. P., Gage, D. A., Hammerschmidt, R., & Somerville, S. C. (1992). Phytoalexin accumulation in arabidopsis thaliana during the hypersensitive reaction to Pseudomonas syringae pv syringae. *Plant Physiology*, 98(4), 1304–1309.
- Walton, J. D. (1994). Deconstructing the Cell Wall. *Plant Physiology*, 104(4), 1113–1118.
- Wang, Q. C., Nie, Q. H., & Feng, Z. H. (2003). RNA interference: Antiviral weapon and beyond. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 9, Issue 8, pp. 1657–1661).
- Warren, R. F., Henk, A., Mowery, P., Holub, E., & Innes, R. W. (1998). A mutation within the leucine-rich repeat domain of the arabidopsis disease resistance gene RPS5 partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. *Plant Cell*, 10(9), 1439–1452.
- Weiberg, A., Wang, M., Bellinger, M., & Jin, H. (2014). Small RNAs: A New Paradigm in Plant-Microbe Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 495–516.
- Wildermuth, M C, Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414(6863), 562–565.
- Wildermuth, Mary C, Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. (2001). *Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence*. 414(November), 0–4.

- Wittstock, U., & Gershenzon, J. (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4), 300–307.
- Wu, H.-J., Wang, Z.-M., Wang, M., & Wang, X.-J. (2013). Widespread long noncoding RNAs as endogenous target mimics for microRNAs in plants. *Plant Physiology*, 161(4), 1875–1884.
- Xu, J., Xie, J., Yan, C., Zou, X., Ren, D., & Zhang, S. (2014). A chemical genetic approach demonstrates that MPK3/MPK6 activation and NADPH oxidase-mediated oxidative burst are two independent signaling events in plant immunity. *Plant Journal*, 77(2), 222–234. <https://doi.org/10.1111/tpj.12382>
- Yang, T., Xue, L., & An, L. (2007). Functional diversity of miRNA in plants. *Plant Science*, 172(3), 423–432.
- Yu, K., Soares, J. M., Mandal, M. K., Wang, C., Chanda, B., Gifford, A. N., Fowler, J. S., Navarre, D., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2013). A Feedback Regulatory Loop between G3P and Lipid Transfer Proteins DIR1 and AZI1 Mediates Azelaic-Acid-Induced Systemic Immunity. *Cell Reports*, 3(4), 1266–1278.
- Zhang, J., Li, W., Xiang, T., Liu, Z., Laluk, K., Ding, X., Zou, Y., Gao, M., Zhang, X., Chen, S., Mengiste, T., Zhang, Y., & Zhou, J. M. (2010). Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host and Microbe*, 7(4), 290–301.
- Zhang, J., & Zhou, J. M. (2010). Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Molecular Plant*, 3(5), 783–793.
- Zhang, W., Gao, S., Zhou, X., Chellappan, P., Chen, Z., Zhou, X., Zhang, X., Fromuth, N., Coutino, G., Coffey, M., & Jin, H. (2011). Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. *Plant Molecular Biology*, 75(1), 93–105.
- Zhao, Y., Mo, B., & Chen, X. (2012). Mechanisms that impact microRNA stability in plants. *RNA Biology*, 9(10), 1218–1223.
- Zou, Y., Wang, S., Zhou, Y., Bai, J., Huang, G., Liu, X., Zhang, Y., Tang, D., & Lu, D. (2018). Transcriptional regulation of the immune receptor FLS2 controls the ontogeny of plant innate immunity. *The Plant Cell*, 30(11), 2779–2794.

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET CONCLUSION

Depuis la découverte des miARN, leur rôle et leur mode d'action au sein de la cellule végétale ont été étudiés d'une manière intensive. A travers les nombreux travaux de recherches, l'implication de ces petits ARN non-codants dans le développement comme dans l'immunité des plantes a été bien établie (Liu et al., 2017; Weiberg et al., 2014; Yang et al., 2007).

Les protéines SDN, grâce à leur activité d'exonucléases, s'inscrivent dans la liste des régulateurs de l'homéostasie des miARN en contrôlant leur dégradation (Ramachandran & Chen, 2008; Sanei & Chen, 2015). Le rôle des SDN dans la mise en place de l'immunité demeure encore inconnu. Dans mon projet de recherche, je me suis focalisé sur l'étude de l'importance du maintien de l'homéostasie des miARN via les protéines SDN dans la mise en place des réponses immunes. Les résultats obtenus ainsi que les perspectives de ce travail sont illustrés dans un schéma récapitulatif ci-dessous (Figure 4.1).

4.1 Implication des protéines SDN dans la mise en place de l'immunité basale et spécifique

Ce travail nous a permis en premier temps de mettre en évidence que les protéines SDN1 et SDN2 sont essentielles à l'établissement d'une résistance efficace médiée par flg22 et de l'effecteur AvrPphB. La voie de l'acide salicylique activée par ces deux éliciteurs est affectée chez le double mutant *sdn1sdn2* en comparaison avec les plantes sauvages Col-0. Cependant, la résistance médiée par les systèmes ETI; AvrRpm1/RPM1 et AvrRps4/RPS4 n'est pas affectée dans les doubles mutants *sdn1sdn2* par rapport aux plantes sauvages.

Nos travaux ont en outre révélé que certaines réponses précoces activées par flg22 semblent indépendantes de l'activité des protéines SDN1 et SDN2. L'étude de l'accumulation des transcrits de WRKY29 et WRKY22 après le traitement avec flg22 sont comparables entre le double mutant *sdn1sdn2* et la plante sauvage Col-0. Nous avons également montré que l'expression relative de RPS5 et de PBS1 est semblable entre *sdn1sdn2* et les plantes sauvages. Étant donné que nous travaillons avec le double mutant *sdn1sdn2* alors qu'on dénombre 5 protéines appartenant à la même famille chez *Arabidopsis thaliana*, il est probable que l'existence d'une redondance de l'activité des protéines SDN est à l'origine des réponses non affectées observées dans les systèmes AvrRpm1 / RPM1 et AvrRps4 / RPS4. Aussi la présence d'autres exonucléases qui ne sont toujours pas identifiées et qui contrôlent la dégradation de certains miARN importants à l'immunité médiées par ces deux systèmes de résistance spécifique est une explication à considérer. De même les travaux de recherches menés par le groupe de Xuemei Chen ont pu démontrer que certains miARN préfèrent se lier à AG10 à la place de AGO1 tel que le cas de miR165/6 ce qui par conséquent a augmenté leur dégradation (Chen et al., 2019). Cette découverte implique que le contrôle de la stabilité de certains miARN peut emprunter une voie indépendante de l'action des protéines SDN et de AGO1 et ce qui peut expliquer le maintien d'une réponse immune efficace dans les systèmes AvrRpm1 / RPM1 et AvrRps4 / RPS4 chez les plantes *sdn1sdn2*.

Il a été auparavant démontré que FLS2 et RPS5 interagissent et forment un complexe chez *Arabidopsis thaliana* (Qi et al., 2011; Zhang et al., 2010). Il est donc possible que les protéines SDN1 et SDN2 contrôlent des acteurs communs qui participent dans l'activation des réponses immunes impliquant les récepteurs FLS2 et RPS5. Un séquençage des petits ARN non-codants pourrait être une expérience à envisager dans le but d'identifier les miARN contrôlés en réponse à flg22 et ceux en réponse à AvrPphB via les protéines SDN1 et SDN2.

4.2 Rôle des protéines SDN dans la mise en place de la Résistance systémique acquise

Dans cette partie du projet, on a réussi à mettre en valeur l'importance des protéines SDN1 et SDN2 dans l'établissement de la SAR où on a pu noter une résistance systémique moins efficace chez les plantes *sdn1sdn2* par rapport aux plantes sauvages Col-0 contre *Pst* DC3000 et ce à travers des expériences d'infection avec cette bactérie hémibiotrophes.

Afin d'aller plus loin dans nos travaux de recherche, nous avons élucidé les acteurs importants de la mise en place de la SAR et qui sont contrôlés par les protéines SDN1 et SDN2.

Dans notre système, la voie de signalisation médiée par l'AS a été affectée au niveau de l'expression du gène PR1 lors de la SAR. Ainsi, la SAR compromise contre le *Pst* DC3000 pourrait être en partie due à une action inadéquate de l'AS. Étant donné que l'acide pipécolique est aussi important à la mise en place de la SAR, l'étude de l'expression de certains gènes clés impliqués dans sa voie de biosynthèse a été réalisée, notamment ALD1, SARD4 et FMO1. Les données des qPCRs ont démontré que l'induction de l'expression de ALD1 et FMO1 est moins élevée chez les plantes *sdn1sdn2* versus les plantes Col-0 au niveau des feuilles locales et systémiques après un traitement à la flagelline. Bien que SARD4 soit considéré aussi comme un gène nécessaire dans la production de Pip, Hartmann et al., ont observé que le mutant *sard4* est plus susceptible que la plante sauvage à *Pseudomonas* au niveau local. Cependant ce même mutant était capable mettre en place une résistance systémique avec une amplitude d'induction comparable à celle des plantes sauvage (Hartmann et al., 2017). Cela a été expliqué par le fait qu'il existe d'autres réductases qui pourraient être à l'origine de l'accumulation de Pip d'une manière indépendante de SARD4 (Hartmann et al., 2017). Ces résultats concordent avec nos résultats où la voie de biosynthèse de Pip est compromise chez double mutant *sdn1sdn2* tout en conservant une expression de SARD4 comparable avec les plantes sauvages Col-0 aux niveaux local et systémique, et ce en réponse à flg22.

Enfin, l'étude de l'accumulation des transcrits de PDL5 qui code pour la production d'une protéine spécifique accumulée au niveau des PD lors d'une infection a montré que l'expression systémique de PDL5 est plus importante chez les plantes WT en comparaison avec le double mutant *sdn1sdn2* lors de l'activation de la SAR. Cela montre clairement que le transport intercellulaire n'est pas correctement régulé pour permettre un mouvement optimal des signaux mobiles des plantes. L'expression de PDL5 a été déjà démontrée cruciale dans la mise en place des réponses de défenses médiées par la voie de l'AS où la surexpression provoque la mort cellulaire et la chlorose alors que l'inhibition de son expression cause une susceptibilité plus accrue aux agents pathogènes. De ce fait, la régulation de l'accumulation de cette protéine semble être contrôlée d'une façon très précise (Lee, 2015). Ces observations vont dans le même sens que nos résultats où les plantes *sdn1sdn2* qui ont montré une résistance moins efficace contre *Pst* DC3000 ont présenté aussi une dérégulation au niveau de l'expression des acteurs clés dans la voie de l'AS et de Pip et ce qui a été aussi couplé avec une expression moins importante des transcrits de PDL5. Ces indications nous dirigent à penser qu'il existe un ou des miARN spécifiques qui régulent la suite de ces processus pour mettre en place les réponses de défenses et qui sont sous le contrôle des protéines SDN1 et SDN2.

4.3 Conclusion générale et perspectives

Dans l'ensemble, ce travail a pu mettre en lumière l'importance du contrôle de l'homéostasie des miARN exercé par les protéines SDN dans la mise en place de la résistance chez *Arabidopsis thaliana*. Ce travail est unique car il montre pour la première fois l'implication de ces exonucléases dans l'immunité des plantes et l'importance du contrôle de l'homéostasie des miARN dans la mise en place de la résistance local et la SAR chez *Arabidopsis thaliana*.

Les résultats obtenus procurent ainsi une compréhension plus claire du système de défense que les végétaux mobilisent pour faire face aux différents agresseurs biotiques et ouvrent

aussi des nouvelles pistes à explorer. Il serait intéressant alors d'identifier les miARN qui sont différentiellement exprimés aux niveau local et systémique suite au traitement avec la flagelline et sélectionner les miARN potentiellement importants dont les cibles prédites ou réelles et qui ont un lien direct ou indirect avec la mise en place de la PTI et la SAR. Il serait aussi intéressant de générer des mutants de ces cibles et de les tester pour leurs réponses immunes en présence des éliciteurs de l'immunité.

Dans le but de pouvoir identifier les cibles potentielles des petits ARN non codants chez les plantes, Dai et al., ont développé le serveur 'psRNATarget' qui, en se basant sur le degré de complémentarité des miARN et des ARNm, est capable de prédire l'existence d'une interaction entre un miARN donné et un ou des transcrits correspondants et vice-versa et ce, tout en se référant à des travaux de recherches publiés (Dai et al., 2018). Grâce à ce programme (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/analysis>) et suivant l'homologie des séquences des gènes cibles on a pu avoir des miARN candidats citant miR418, miR5028 et miR854 qui cibleraient respectivement de ALD1, FMO1 et PDL5 en provoquant le clivage des transcrits correspondants. Par conséquent, ces miARN pourraient avoir un rôle direct dans la régulation post-transcriptionnelle durant les réponses défense chez *Arabidopsis*. Mes premières tentatives de quantification des miARN s'avèrent non fructueuses et variables d'une expérience à une autre. Cependant, il me semble important d'évaluer l'impact de ces miARN dans les réponses immunes médiées par la flagelline chez *A. thaliana*.

Ce projet, a procuré une image plus lucide des mécanismes qui régissent la mise en place des réponses de défenses chez les plantes où le maintien du contrôle de l'homéostasie des miARN au niveau des cellules végétales paraît crucial pour une réponse immunitaire efficace. Ainsi, l'identification de miARN qui sont sous le contrôle des protéines SDN1 et SDN2 et qui sont importants dans l'immunité végétale serait un atout pour la compréhension du rôle de ses protéines. Ensuite, la manipulation de l'expression de ces petits ARN non-codants pour promouvoir les réponses de défenses pourrait être une solution pour minimiser l'utilisation de produit chimiques. De ce fait, la mise en évidence

de nouveaux acteurs de l'immunité constitue une nouvelle avenue à explorer afin de trouver des nouvelles stratégies de lutte phytosanitaire, qui peut se manifester par le développement de plantes plus résistantes possédants un système de défense plus robuste.

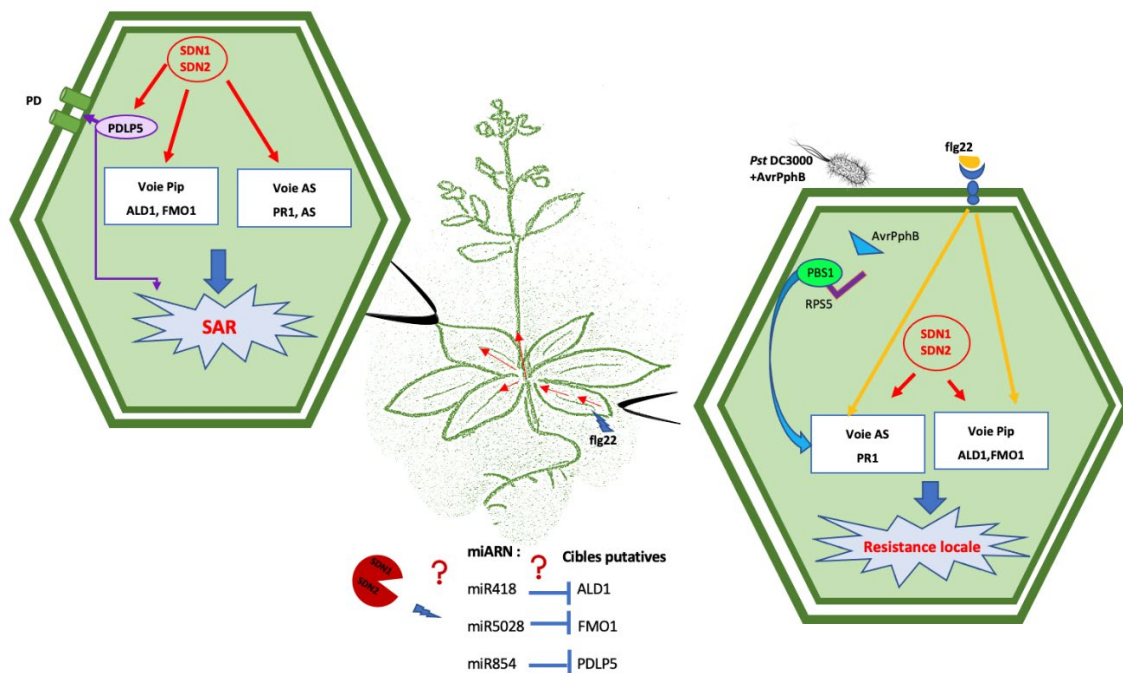


Figure 4.1. Schéma récapitulatif illustrant les résultats et les perspectives

Résistance locale : Les protéines SDN1 et SDN2 contribuent à l'activation de la résistance locale médiée par flg22 et par le système RPS5/AvrPphB et participent à l'induction de la voie de l'acide salicylique et l'acide pipécolique. **Résistance systémique :** Les protéines SDN sont essentielles à la mise en place d'une résistance systémique acquise efficace. Selon les résultats obtenus, ces exonucléases régulent systématiquement les voies de signalisation et de biosynthèse de l'acide pipécolique et de l'acide salicylique mais régulent aussi l'expression de PDLP5 ; une protéine qui s'accumule au niveau des plasmodemes et est importante à la SAR.

Grâce à un outil informatique, miR418, miR5028 et miR854 qui cibleraient respectivement ALD1, FMO1 et PDLP5, pourraient être impliqués dans la régulation de l'immunité dans notre système d'étude.

SDN : small- RNA degrading nucleases, **AS** : Acide salicylique, **Pip** : Acide pipécolique, **PR1** : Pathogenesis related protein 1, **FMO1** : Flavine-dependent monooxygenase 1, **ALD1** : AGD2-Like Defense response protein1, **PDLP5** : Plasmodesmata located protein 5, **PD**: plasmodesme, **Pst DC3000**: *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000, **AvrPphB** : effecteur de *Pseudomonas phaseolicola*, **RPS5** : protéine de résistance à *Pseudomonas Syringae* 5

BIBLIOGRAPHIE

- Ausubel, F. M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology*, 6(10), 973–979.
- Avanci, N. C., Luche, D. D., Goldman, G. H., & Goldman, M. H. (2010). Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 9(1), 484–505.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431(7006), 356–363.
- Ben Rejeb, I., Pastor, V., & Mauch-Mani, B. (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: Molecular mechanisms. *Plants*, 3(4), 458–475.
- Bernsdorff, F., Döring, A. C., Gruner, K., Schuck, S., Bräutigam, A., & Zeier, J. (2016). Pipecolic acid orchestrates plant systemic acquired resistance and defense priming via salicylic acid-dependent and -independent pathways. *The Plant Cell*, 28(1), 102–129.
- Bhogale, S., Mahajan, A. S., Natarajan, B., Rajabhoj, M., Thulasiram, H. V., & Banerjee, A. K. (2014). MicroRNA156: A potential graft-transmissible microrna that modulates plant architecture and tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Plant Physiology*, 164(2), 1011–1027.
- Boccaro, M., Sarazin, A., Thibeault, O., Jay, F., Voinnet, O., Navarro, L., & Colot, V. (2014). The Arabidopsis miR472-RDR6 Silencing Pathway Modulates PAMP- and Effector-Triggered Immunity through the Post-transcriptional Control of Disease Resistance Genes. *PLoS Pathogens*, 10(1).
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379–406.
- Boots, M., & Best, A. (2018). The evolution of constitutive and induced defences to infectious disease. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1883).
- Borges, F., & Martienssen, R. A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Publishing Group*, 16(12), 1–15.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642–655.

- Castel, S. E., & Martienssen, R. a. (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, 14(2), 100–112.
- Cavalier, D. M., Lerouxel, O., Neumetzler, L., Yamauchi, K., Reinecke, A., Freshour, G., Zabolina, O. A., Hahn, M. G., Burgert, I., Pauly, M., Raikhel, N. V, & Keegstra, K. (2008). Disrupting two *Arabidopsis thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. *The Plant Cell*, 20(6), 1519–1537.
- Chang, J. H., Urbach, J. M., Law, T. F., Arnold, L. W., Hu, A., Gombar, S., Grant, S. R., Ausubel, F. M., & Dangl, J. L. (2005). A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7), 2549–2554.
- Chen, H., Xue, L., Chintamanani, S., Germain, H., Lin, H., Cui, H., Cai, R., Zuo, J., Tang, X., Li, X., Guo, H., & Zhou, J.-M. (2009). ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 Repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 Expression to Negatively Regulate Plant Innate Immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(8), 2527–2540.
- Chen, L., Wang, W. S., Wang, T., Meng, X. F., Chen, T. T., Huang, X. X., Li, Y. J., & Hou, B. K. (2019). Methyl salicylate glucosylation regulates plant defense signaling and systemic acquired resistance. *Plant Physiology*, 180(4), 2167–2181.
- Chen, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5666), 2022–2025.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. G., Felix, G., & Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 448(7152), 497–500.
- Cowger, C., & Sutton, A. L. (2005). The Southeastern U . S . Fusarium Head Blight Epidemic of 2003 Plant Health Progress Plant Health Progress. *Plant Health Progress.*, October.
- Dai, X., Zhuang, Z., & Zhao, P. X. (2018). PsRNATarget: A plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W49–W54.
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539–548.
- Dunoyer, P., Melnyk, C., Molnar, A., & Keith Slotkin, R. (2013). Plant mobile small RNAs. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(7), 3–5.
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), 185–209.

- Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., Somerville, S. C., & Voigt, C. A. (2013). Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 161(3), 1433–1444.
- Eulgem, T., & Somssich, I. E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), 366–371.
- Feys, B. J., Moisan, L. J., Newman, M. A., & Parker, J. E. (2001). Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO Journal*, 20(19), 5400–5411.
- Fu, Z. Q., & Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, 64(January), 839–863.
- Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S. H., Tada, Y., Zheng, N., & Dong, X. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486(7402), 228–232.
- Gamir, J., Darwiche, R., van't Hof, P., Choudhary, V., Stumpe, M., Schneiter, R., & Mauch, F. (2017). The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *Plant Journal*, 89(3), 502–509.
- Gang, D. R., Kasahara, H., Xia, Z. Z.-Q., Mijnsbrugge, K. Vander, Bauw, G., Boerjan, W., Montagu, M. Van, Davin, L. B., Lewis, N. G., Vander Mijnsbrugge, K., Bauw, G., Boerjan, W., Van Montagu, M., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (1999). Evolution of Plant Defense Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 274(11), 7516–7527.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
- Guo, H.-S. H.-S., Xie, Q., Fei, J.-F., & Chua, N.-H. (2005). MicroRNA Directs mRNA Cleavage of the Transcription Factor NAC1 to Downregulate Auxin Signals for Arabidopsis Lateral Root Development. *The Plant Cell Online*, 17(5), 1376–1386.
- Hartmann, C., Corre-Menguy, F., Boualem, A., Jovanovic, M., & Lelandais-Brière, C. (2004). MicroRNAs: A new class of gene expression regulators. *Medecine/Sciences*, 20(10), 894–898.
- Hartmann, M., Kim, D., Bernsdorff, F., Ajami-Rashidi, Z., Scholten, N., Schreiber, S., Zeier, T., Schuck, S., Reichel-Deland, V., & Zeier, J. (2017). Biochemical principles and functional aspects of pipecolic acid biosynthesis in plant immunity. *Plant Physiology*, 174(1), 124–153.

- Innes, R. (2018). The Positives and Negatives of NPR: A Unifying Model for Salicylic Acid Signaling in Plants. *Cell*, 173(6), 1314–1315.
- Jackson, R. D. (1986). Remote Sensing of Biotic and abiotic plant stress. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 24(92), 265–287.
- Jetter, R., & Schäffer, S. (2001). Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiology*, 126(4), 1725–1737.
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., & Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO Journal*, 19(15), 4004–4014.
- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., & Greenberg, J. T. (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science*, 324(5923), 89–91.
- Kachroo, A., & Robin, G. P. (2013). Systemic signaling during plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(4), 527–533.
- Kasai, A., Kanehira, A., & Harada, T. (2010). miR172 Can Move Long Distances in *Nicotiana benthamiana*. *The Open Plant Science Journal*, 4(1), 1–7.
- Kim, C. Y., & Zhang, S. (2004). Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant Journal*, 38(1), 142–151.
- Lamichhane, J. R., Varvaro, L., Parisi, L., Audergon, J. M., & Morris, C. E. (2014). Disease and frost damage of woody plants caused by *Pseudomonas syringae*: Seeing the forest for the trees. In *Advances in Agronomy* (Vol. 126). Elsevier.
- Lebailly, P., Niez, E., & Baldi, I. (2007). Données épidémiologiques sur le lien entre cancers et pesticides. *Oncologie*, 9(5), 361–369.
- Lee, J. Y. (2015). Plasmodesmata: A signaling hub at the cellular boundary. *Current Opinion in Plant Biology*, 27, 133–140.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854.
- Li, Y., Zhang, Q., Zhang, J., Wu, L., Qi, Y., & Zhou, J. M. (2010). Identification of MicroRNAs Involved in Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Plant Innate Immunity. *Plant Physiology*, 152(4), 2222–2231.
- Lim, G. H., Shine, M. B., De Lorenzo, L., Yu, K., Cui, W., Navarre, D., Hunt, A. G., Lee, J. Y., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2016). Plasmodesmata Localizing Proteins Regulate

Transport and Signaling during Systemic Acquired Immunity in Plants. *Cell Host and Microbe*, 19(4), 541–549.

Lin, S. I., Chiang, S. F., Lin, W. Y., Chen, J. W., Tseng, C. Y., Wu, P. C., & Chiou, T. J. (2008). Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiology*, 147(2), 732–746.

Liu, S. R., Zhou, J. J., Hu, C. G., Wei, C. L., & Zhang, J. Z. (2017). MicroRNA-mediated gene silencing in plant defense and viral counter-defense. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), 1–12.

Lu, S., Sun, Y. H., & Chiang, V. L. (2009). Adenylation of plant miRNAs. *Nucleic Acids Research*, 37(6), 1878–1885.

Luna, E., Bruce, T. J. A., Roberts, M. R., Flors, V., & Ton, J. (2012). Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiology*, 158(2), 844–853.

Mann, D. D., Buening, G. M., Osweiler, G. D., & Hook, B. S. (1984). Effect of subclinical levels of T-2 toxin on the bovine cellular immune system. *Canadian Journal of Comparative Medicine. Revue Canadienne de Médecine Comparée*, 48(3), 308–312. h

Mcmullen, M., Jones, R., Gallenberg, D., & America, S. (1997). Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 81(12).

Megraw, M., Baev, V., Rusinov, V., Jensen, S. T., Kalantidis, K., & Hatzigeorgiou, A. G. (2006). MicroRNA promoter element discovery in Arabidopsis. *RNA (New York, N.Y.)*, 12(9), 1612–1619.

Mermigka, G., Verret, F., & Kalantidis, K. (2016). RNA silencing movement in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(4), 328–342.

Moreau, M., Tian, M., & Klessig, D. F. (2012). Salicylic acid binds NPR3 and NPR4 to regulate NPR1-dependent defense responses. *Cell Research*, 22(12), 1631–1633. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.100>

Morris, C. E., & Moury, B. (2019). Revisiting the Concept of Host Range of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 57(1), 63–90.

Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., & Jones, J. D. G. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5772), 436–439.

Osbourn, A. (1996). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *The Plant Cell*, 8(10), 1821–1831.

- Pereira, A. (2016). Plant abiotic stress challenges from the changing environment. *Frontiers in Plant Science*, 7(JULY2016), 2013–2015.
- Pernezny, K., Elliott, M., Palmateer, A., & Havranek, N. (2014). *Guidelines for Identification and Management of Plant Disease Problems : Part II . Diagnosing Plant Diseases Caused by Fungi , Bacteria and Viruses 1*.
- Ramachandran, V., & Chen, X. (2008). Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5895), 1490–1492.
- Rekhter, D., Lüdke, D., Ding, Y., Feussner, K., Zienkiewicz, K., Lipka, V., Wiermer, M., Zhang, Y., & Feussner, I. (2019). Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid. *Science*, 365(6452), 498–502.
- Ren, G., Chen, X., & Yu, B. (2012). Uridylation of miRNAs by HEN1 SUPPRESSOR1 in arabidopsis. *Current Biology*, 22(8), 695–700.
- Rietz, S., Stamm, A., Malonek, S., Wagner, S., Becker, D., Medina-Escobar, N., Corina Vlot, A., Feys, B. J., Niefind, K., & Parker, J. E. (2011). Different roles of Enhanced Disease Susceptibility1 (EDS1) bound to and dissociated from Phytoalexin Deficient4 (PAD4) in Arabidopsis immunity. *New Phytologist*, 191(1), 107–119.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. G. (2011). Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 317–343.
- Rogers, K., & Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell*, 25(7), 2383–2399.
- Rosebrock, T. R., Zeng, L., Brady, J. J., Abramovitch, R. B., Xiao, F., & Martin, G. B. (2007). A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature*, 448(7151), 370–374.
- Sanei, M., & Chen, X. (2015). Mechanisms of microRNA turnover. *Current Opinion in Plant Biology*, 27, 199–206.
- Schulze-Lefert, P., & Robatzek, S. (2006). Plant Pathogens Trick Guard Cells into Opening the Gates. *Cell*, 126(5), 831–834.
- Schweizer, P., Felix, G., Buchala, A., Müller, C., & Métraux, J. P. (1996). Perception of free cutin monomers by plant cells. In *Plant Journal* (Vol. 10, Issue 2, pp. 331–341).
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M. A., Cammue, B. P. A., & De Bolle, M. F. C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(11), 941–950.

- Shah, J., & Zeier, J. (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 4(February), 1–16.
- Shan, L., & He, P. (2018). Pipped at the Post: Pipecolic Acid Derivative Identified as SAR Regulator. *Cell*, 173(2), 286–287.
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S. C., Martin, G. B., Sheen, J., Morgenstriebe, D., & Tübingen, D.-. (2008). Bacterial Effectors Target the Common Signaling Partner BAK1 to Disrupt Multiple MAMP Receptor-Signaling Complexes and Impede Plant Immunity. *Cell Host and Microbe*, 4(1), 17–27.
- Shine, M. B., Xiao, X., Kachroo, P., & Kachroo, A. (2019). Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant Science*, 279(December 2017), 81–86.
- Shivaprasad, P. V., Chen, H., Patel, K., Bond, D. M., Santos, B. A. C. M., & Baulcombe, D. C. (2012). A MicroRNA Superfamily Regulates Nucleotide Binding Site – Leucine-Rich Repeats and Other mRNAs. *The Plant Cell*, 24(March), 859–874.
- Smith, J. M., Heese, A., Dodds, P., Rathjen, J., Boller, T., Felix, G., Monaghan, J., Zipfel, C., Boller, T., He, S., Lindeberg, M., Cunnac, S., Collmer, A., Xin, X.-F., He, S., Munkvold, K., Martin, G., Mansfield, J., Newman, M.-A., ... Chinchilla, D. (2014). Rapid bioassay to measure early reactive oxygen species production in Arabidopsis leaf tissue in response to living *Pseudomonas syringae*. *Plant Methods*, 10(1), 6.
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., Pelt, J. A. Van, Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., Loon, L. C. Van, Dong, X., & Pieterse, C. M. J. (2003). NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *The Plant Cell*, 15(March), 760–770.
- Suh, M., Samuels, A., & Jetter, R. (2005). Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in Arabidopsis stem epidermis. *Plant Physiology*, 139(December), 1649–1665.
- Tandon, G., Jaiswal, S., Iqbal, M. a., Kumar, S., Kaur, S., Rai, A., & Kumar, D. (2015). Evidence of salicylic acid pathway with EDS1 and PAD4 proteins by molecular dynamics simulation for grape improvement. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 33(September), 1–12.
- Tateda, C., Zhang, Z., Shrestha, J., Jelenska, J., Chinchilla, D., & Greenberg, J. T. (2014). Salicylic Acid Regulates Arabidopsis Microbial Pattern Receptor Kinase Levels and Signaling. *The Plant Cell*, 26(10), 4171–4187.

- Tateda, Chika, Zhang, Z., & Greenberg, J. T. (2015). Linking pattern recognition and salicylic acid responses in Arabidopsis through ACCELERATED CELL DEATH6 and receptors. *Plant Signaling & Behavior*, 10(10), e1010912.
- Tekauz, A., McCallum, B., & Gilbert, J. (2000). Review: Fusarium head blight of barley in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22(1), 9–16.
- Tsuji, J., Jackson, E. P., Gage, D. A., Hammerschmidt, R., & Somerville, S. C. (1992). Phytoalexin accumulation in Arabidopsis thaliana during the hypersensitive reaction to Pseudomonas syringae pv syringae. *Plant Physiology*, 98(4), 1304–1309.
- Walton, J. D. (1994). Deconstructing the Cell Wall. *Plant Physiology*, 104(4), 1113–1118.
- Weiberg, A., Wang, M., Bellinger, M., & Jin, H. (2014). Small RNAs: A New Paradigm in Plant-Microbe Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 495–516.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414(6863), 562–565.
- Wittstock, U., & Gershenzon, J. (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4), 300–307.
- Wu, H.-J., Wang, Z.-M., Wang, M., & Wang, X.-J. (2013). Widespread long noncoding RNAs as endogenous target mimics for microRNAs in plants. *Plant Physiology*, 161(4), 1875–1884.
- Xu, J., Xie, J., Yan, C., Zou, X., Ren, D., & Zhang, S. (2014). A chemical genetic approach demonstrates that MPK3/MPK6 activation and NADPH oxidase-mediated oxidative burst are two independent signaling events in plant immunity. *Plant Journal*, 77(2), 222–234.
- Yang, T., Xue, L., & An, L. (2007). Functional diversity of miRNA in plants. *Plant Science*, 172(3), 423–432.
- Zhang, J., & Zhou, J. M. (2010). Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Molecular Plant*, 3(5), 783–793.
- Zhang, W., Gao, S., Zhou, X., Chellappan, P., Chen, Z., Zhou, X., Zhang, X., Fromuth, N., Coutino, G., Coffey, M., & Jin, H. (2011). Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. *Plant Molecular Biology*, 75(1), 93–105.
- Zhao, Y., Mo, B., & Chen, X. (2012). Mechanisms that impact microRNA stability in plants. *RNA Biology*, 9(10), 1218–1223.

Zou, Y., Wang, S., Zhou, Y., Bai, J., Huang, G., Liu, X., Zhang, Y., Tang, D., & Lu, D. (2018). Transcriptional regulation of the immune receptor FLS2 controls the ontogeny of plant innate immunity. *The Plant Cell*, 30(11), 2779–2794.

